Leica TCS SP5
Leica TCS SP5 X

Manuel d’utilisation

Leica
MICROSYSTEMS

Édité par :

Leica Microsystems CMS GmbH
Am Friedensplatz 3
D-68165 Mannheim (Germany)

http://www.leica-microsystems.com
http://www.confocal-microscopy.com

Responsable du contenu rédactionnel : Leica Microsystems CMS GmbH

Copyright © Leica Microsystems CMS GmbH.
Tous droits réservés.

Sommaire

1. Allgemeines 9

1.1 Copyright 9

1.2 A propos de ce mode d'emploi 10

2. Leica TCS SP5 / TCS SP5 X 11

2.1 Aperçu du système TCS SP5 11

2.2 Aperçu du système TCS SP5 X 12

2.3 Utilisation conforme aux prescriptions 12

2.4 Conformité 13

2.5 Brevets 14

2.6 N° de série 14

2.7 Spécifications 15

2.7.1 Dimensions 15

2.7.1.1 TCS SP5 avec microscope inversé 15

2.7.1.2 TCS SP5 avec microscope droit 15

2.7.1.3 TCS SP5 X avec microscope inversé 16

2.7.1.4 TCS SP5 X avec microscope droit 16

2.7.2 Données de raccordement électrique 17

2.7.2.1 Données de raccordement électrique de l'unité d'alimentation 17

2.7.2.2 Données de raccordement électrique du laser à lumière blanche 17

2.7.3 Exigences concernant le site 18

2.7.4 Conditions ambiantes admissibles 18

2.7.5 Dissipation de chaleur par le système et puissance frigorifique requise 19

2.8 Equipement 19

2.8.1 Vue d'ensemble des lasers VIS/UV utilisables 19

2.8.2 Vue d'ensemble des lasers MP (lasers IR) utilisables 20

2.8.2.1 Lasers picosecondes 20

2.8.2.2 Lasers femtosecondes 21

2.8.3 Vue d'ensemble des lasers VIS/UV utilisables avec le TCS SP5 X 22

2.8.4 À quelle classe de laser ce produit correspond-il ? 23

2.8.5 Mesures de sécurité concernant le laser 23

3. Les consignes de sécurité et leur signification 25

4. Consignes de sécurité générales 27
4.1 Classe de laser pour systèmes VIS et UV 27
4.2 Classe de laser pour systèmes MP 27
4.3 Quelles sont les obligations de l'exploitant ? 27
4.4 Consignes de sécurité pour l'utilisateur 29
4.5 Sécurité de fonctionnement 29
4.6 Charge électrique maximale du bloc multiprises de l'unité d'alimentation 30
5. Dispositifs de sécurité 31
5.1 Disjoncteur 31
5.2 Interrupteur à clé 32
5.3 Voyants indicateurs d'émission laser 34
5.4 Prise de verrouillage à distance (Interlock) sur l'unité d'alimentation électrique 35
5.5 Prise de verrouillage à distance sur le laser à lumière blanche 36
5.6 Prise de verrouillage à distance sur les lasers externes 38
5.7 Prise de verrouillage à distance (Interlock) sur le scanneur 38
5.8 Fonction et position des interrupteurs de sécurité 39
5.9 Dispositifs spéciaux concernant la sécurité laser 40
5.9.1 Gaine de protection laser et capteur de faisceau 40
5.9.2 Protection avec les systèmes MP (lasers IR) 41
5.10 Marques de sécurité sur le système 42
5.10.1 Microscope inversé DMI 6000 CS 42
5.10.2 Microscope droit DM 5000/6000 CS 44
5.10.3 Tête de balayage 46
5.10.4 Laser à lumière blanche 47
5.10.5 Laser externe UV 48
5.10.6 Unité d'alimentation électrique 49
5.10.7 Unité de couplage de faisceau MP 50
5.10.8 Cache (pour bride de rechange) 51
5.10.9 Boîtier à miroir 52
6. Consignes de sécurité concernant l'exploitation du système 53
6.1 Exigences concernant le lieu d'installation/lieu de stockage 53
6.2 Consignes de sécurité générales relatives à l'exploitation 53
6.3 Protection oculaire 54
6.3.1 Système MP avec microscope droit 54

6.3.2 Système MP avec microscope inversé 54
6.3.3 Systèmes VIS et UV avec microscope inversé ou droit 55
6.4 Espace propre à l'échantillon 56
6.5 Changement des échantillons 57
6.6 Changement d'objectif 58
6.7 Changer le boîtier de lampe diascopique 59
6.8 Boîtier à miroir sur microscope droit 61
6.9 Changer le bloc de filtres, le répartiteur optique ou le condenseur 63
6.10 Mise au point piézo-électrique sur microscope droit 64
6.10.1 Changement d'objectif avec une mise au point piézo-électrique 65

7. Mise en service du système 67
7.1 Mise en marche du système 67
7.2 Exécution de LAS AF 72
7.3 Création d'un utilisateur 74

8. Mise hors circuit du système 75

9. Introduction au LAS AF 77
9.1 Généralités 77
9.2 Aide en ligne 77
9.2.1 Organisation de l'Aide en ligne 77
9.2.2 Appel de l'Aide en ligne 78
9.2.3 Recherche globale avec critères de recherche à liens logiques 79
9.3 Organisation de l'interface utilisateur 79
9.3.1 Organisation générale de l'interface utilisateur 79
9.4 Raccourcis clavier 81

10. Introduction au travail confocal 83
10.1 Préparation 83
10.1.1 L'objectif 84
10.1.2 Microscopie classique 84
10.1.3 Pourquoi faire un balayage ? 87
10.1.4 Comment s'effectue une coupe optique ? 88
10.2 Enregistrement de coupes optiques 90
10.2.1 Enregistrement de données 90
10.2.2 Éclairage 92
10.2.3 Division du faisceau lumineux 93

10.2.4 Bandes d'émission 94
10.2.5 Le trou d'aiguille et son effet 95
10.2.6 Section d'image et réglages de la grille 97
10.2.7 Signal et bruit 101
10.2.8 Coupes de profil 103
10.3 Fluorescence multiparamétrique 104
10.3.1 Éclairage 105
10.3.2 Division du faisceau lumineux 106
10.3.3 Bandes d'émission 106
10.3.4 Crosstalk 106
10.3.5 Enregistrement séquentiel 107
10.3.6 Unmixing 108
10.4 Séries 3D 109
10.4.1 Pile z 109
10.4.2 Épaisseurs de coupe 109
10.4.3 Distances 109
10.4.4 Quantités de données 110
10.4.5 Représentations 110
10.4.5.1 Galerie 111
10.4.5.2 Films 111
10.4.5.3 Projections orthogonales 111
10.4.5.4 Projections orientées 112
10.5 Séries chronologiques 113
10.5.1 Vitesse de balayage 113
10.5.2 Points 113
10.5.3 Lignes 113
10.5.4 Surfaces 113
10.5.5 Dimensions (Time-Space) 114
10.5.6 Mesures FRAP 114
10.6 Séries spectrales 114
10.6.1 Enregistrement et utilisation des données 114
10.6.2 Au sujet de la résolution spectrale 115
10.7 Combinatorique 115

11. Maintenance et entretien 117
11.1 Généralités 117
11.2 Nettoyage du système optique 117
11.3 Nettoyage de la surface du microscope 118
11.4 Maintenance du système de refroidissement du scanneur 118
12. Transport et dépollution 119
12.1 Changement de lieu d'installation 119
12.2 Élimination des déchets 119
13. Contact 121
14. Glossaire 123
15. Annexe 129
15.1 Fiches techniques de sécurité des constructeurs tiers 129
15.2 Déclaration de conformité 134

1. Allgemeines

1.1 Copyright

Les informations contenues dans le présent document représentent l'état actuel de la technique et des connaissances. Nous avons rédigé ce document (texte et figures) avec le plus grand soin. Toutefois, nous n'assumons aucune responsabilité, quelle qu'elle soit, pour l'exactitude du contenu de ce manuel. Si vous souhaitez faire des commentaires sur ce mode d'emploi ou sur notre documentation en général, nous vous remercions dès maintenant de nous faire parvenir vos suggestions. Les informations contenues dans ce mode d'emploi peuvent faire l'objet d'une modification sans préavis.

Leica Microsystems CMS GmbH est détenteur de tous les droits d'auteur de cette documentation. L'adaptation, la traduction et la reproduction du texte et des figures, même partielle, par impression, photocopie, microfilm ou autres procédures, dont celles impliquant des systèmes électroniques, ne sont permises qu'avec l'autorisation expresse et écrite de Leica Microsystems CMS GmbH.

Les programmes tels que LAS et LAS AF sont protégés par des lois sur les droits d'auteur (Copyright). Tous droits réservés. Toute reproduction, adaptation ou traduction de ces programmes est interdite sans autorisation écrite préalable de Leica Microsystems CMS GmbH.

Le terme Windows peut figurer dans ce document, sans indication spécifique. Il s'agit d'une marque déposée de Microsoft Corporation. Sinon, même si des noms de marques sont utilisés sans mention particulière, l'on ne peut en déduire pour autant que leur utilisation est libre. Tous les autres noms de marque et noms de produit mentionnés dans ce document sont des marques, marques de prestation, marques de fabrique ou marques déposées des fabricants respectifs.

fabriqué en République Fédérale d'Allemagne.

© Copyright Leica Microsystems CMS GmbH.
Tous droits réservés.

1.2 A propos de ce mode d'emploi

Quand il est question du système ou que le système n'est pas précisé, les remarques, instructions et informations valent pour le TCS SP5 et le TCS SP5 X.

Le présent mode d'emploi fait principalement état des consignes de sécurité, qui doivent être strictement observées lors du travail avec le Leica TCS SP5 et le Leica TCS SP5 X.

En outre, ce mode d'emploi vous donne un bref aperçu du principe de fonctionnement de microscopes à balayage laser. Le manuel vous montre les premiers pas pour le démarrage et la mise en service du système, et vous fournit des informations très utiles sur le logiciel Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF).

Le système est livré avec la version actuelle de LAS AF. Afin de maintenir les informations à l'état le plus récent, il a été sciemment renoncé à la description de fonctions logicielles dans ce mode d'emploi. À la place, nous renvoyons à l'aide en ligne du logiciel LAS AF, dans laquelle vous trouverez les explications et instructions les plus récentes concernant les fonctions logicielles appropriées.

Veuillez lire le chapitre "Introduction au LAS AF" dans ce mode d'emploi, afin de vous familiariser avec la construction et l'utilisation du produit. Vous trouverez dans l'aide en ligne des informations complémentaires sur des fonctions précises.

2. Leica TCS SP5 / TCS SP5 X

2.1 Aperçu du système TCS SP5

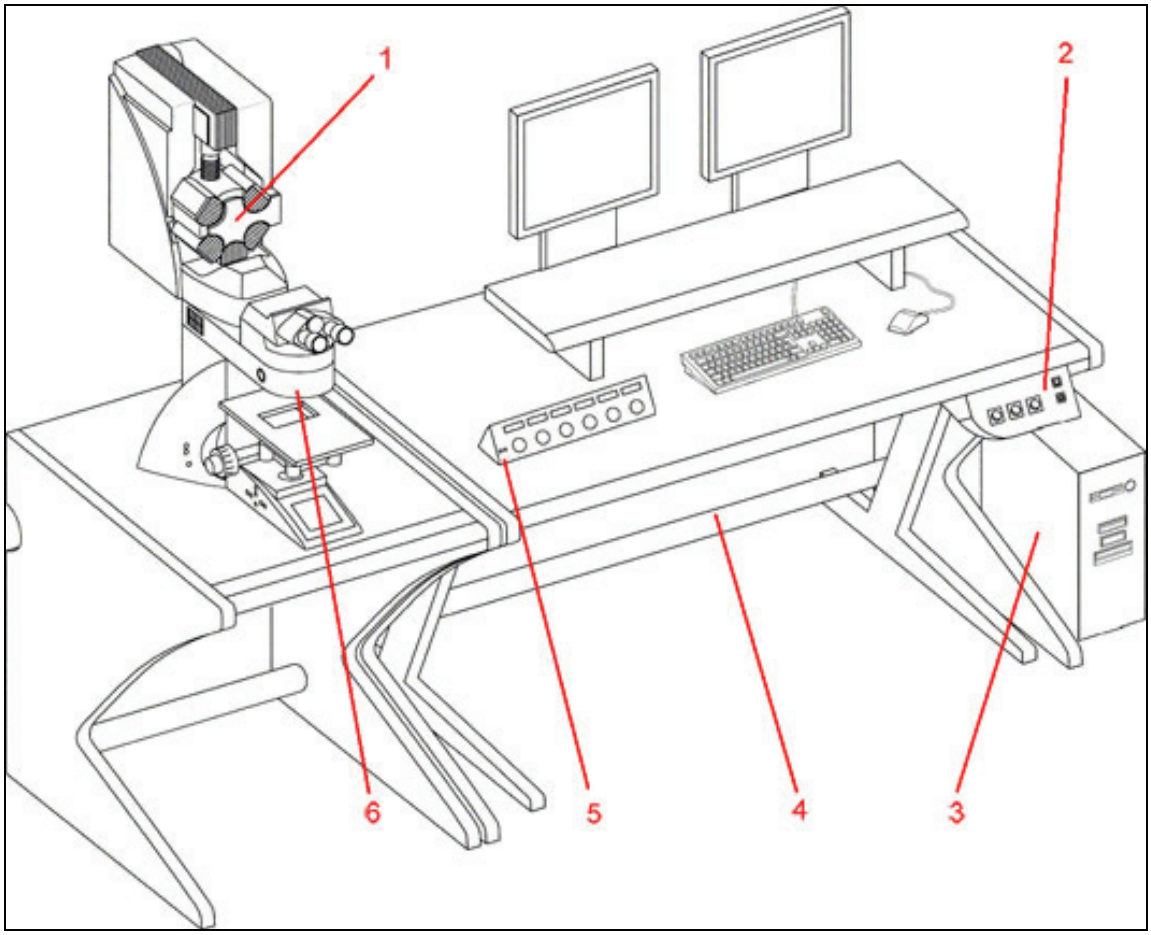


Figure 1 : Composants système du TCS SP5 (vue d'ensemble)

1 Scanneur du TCS SP5
2 Pupitre de commande
3 Station de travail TCS
4 Unité d'alimentation électrique
5 Console de commande
6 Microscope

2.2 Aperçu du système TCS SP5 X

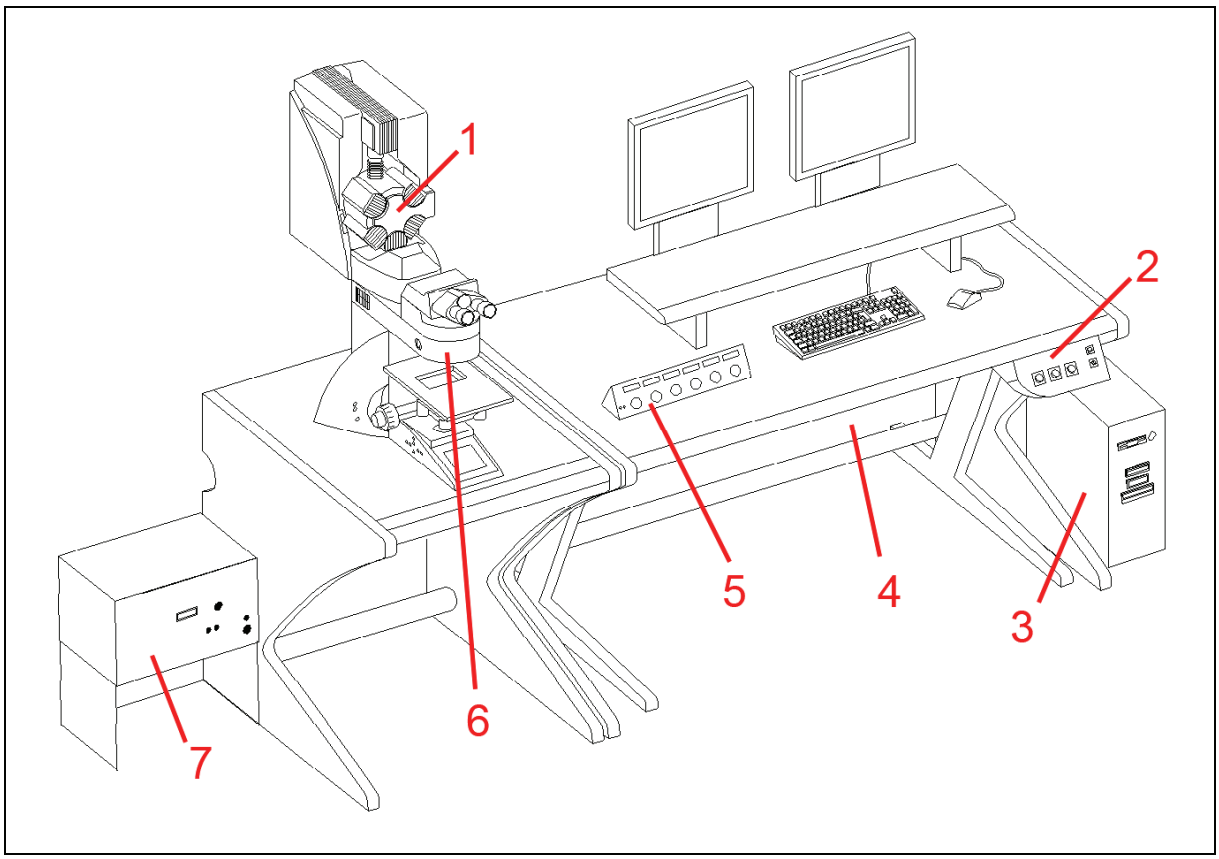


Figure 2 : Composants système du TCS SP5 X (vue d'ensemble)

1 Scanneur du TCS SP5 X
2 Pupitre de commande
3 Station de travail TCS
4 Unité d'alimentation électrique
5 Console de commande
6 Microscope
7 Laser à lumière blanche

2.3 Utilisation conforme aux prescriptions

Le système a été développé pour une acquisition d'image à foyer commun (images balayées au laser) d'échantillons vivants ou fixés, à marquage fluorescent, ainsi que pour la mesure quantitative dans le domaine des sciences biologiques.

Ce système est prévu pour une utilisation en laboratoire.

Les applications du diagnostic in-vitro, au sens de la loi sur les produits médicaux, sont exclues de l'utilisation conforme aux prescriptions.

Le fabricant décline toute responsabilité pour toute utilisation non conforme aux prescriptions et aux spécifications de Leica Microsystems CMS GmbH, ainsi que concernant les éventuels risques en résultant. En pareils cas, la déclaration de conformité perd sa validité.

2.4 Conformité

Cet appareil a fait l'objet de tests et il est conforme aux exigences des normes suivantes :

CEI/EN 61010-1	"Dispositions relatives à la sécurité des instruments électriques de mesure, de commande, de réglage et de laboratoire"
CEI/EN 60825-1	"Sécurité des appareils à laser, partie 1 : classification des matériels, prescriptions et guide de l'utilisateur"
CEI/EN 61326	"Matériels électriques de mesure, de commande et de laboratoire - Prescriptions relatives à la CEM" (classe A). Il s'agit d'un appareil de Classe A pour l'utilisation dans des bâtiments non habitationnels et pour l'utilisation dans des bâtiments qui ne sont pas raccordés directement au réseau électrique basse tension qui alimente les bâtiments habitationnels.
CEI/EN 61000-3-2	"Compatibilité électromagnétique" (CEM) Partie 3-2: Limites - Limites pour les émissions de courant harmonique
CEI/EN 61000-3-3	"Compatibilité électromagnétique" (CEM) Partie 3-3 : limitation des variations de tension, des fluctuations de tension et du papillotement dans les réseaux publics d'alimentation basse tension.

La déclaration de conformité pour le système est fournie en annexe à ce mode d'emploi.

Pour l'utilisation aux USA :

CDRH 21 CFR 1040.10:	Laser Products U.S. Food and Drug Administration (FDA) (”Complies with FDA performance standards for laser products except for deviations pursuant to laser notice No. 50, dated 26 July, 2001.

Pour les Etats-Unis (zone de compétence des CDRH/FDA (USA), il faut remplacer dans le texte la désignation Classe de laser 3B par IIIb et la désignation Classe 4 par IV.

2.5 Brevets

Le produit Leica TCS SP5 est protégé par les brevets américains :
5,886,784; 5,903,688; 6,137,627; 6,222,961; 6,285,019; 6,311,574; 6,355,919; 6,423,960; 6,433,814; 6,444,971; 6,466,381; 6,510,001; 6,614,526; 6,654,165; 6,657,187; 6,678,443; 6,687,035; 6,738,190; 6,754,003; 6,801,359; 6,831,780; 6,850,358; 6,867,899.
D'autres demandes de brevets ont été déposées.

Le produit Leica TCS SP5 X est protégé par les brevets américains :
5,886,784; 5,903,688; 6,137,627; 6,222,961; 6,285,019; 6,311,574; 6,355,919; 6,423,960; 6,433,814; 6,444,971; 6,466,381; 6,510,001; 6,567,164; 6,611,643; 6,614,526; 6,654,165; 6,654,166; 6,657,187; 6,678,443; 6,687,035; 6,710,918; 6,738,190; 6,754,003; 6,796,699; 6,801,359; 6,806,953; 6,831,780; 6,850,358; 6,867,899; 6,888,674; 6,898,367; 6,958,858; 6,961,124; 7,005,654; 7,092,086; 7,110,645; 7,123,408.
D'autres demandes de brevets ont été déposées.

2.6 N° de série

Le numéro de série de votre système est apposé au dos du scanneur :

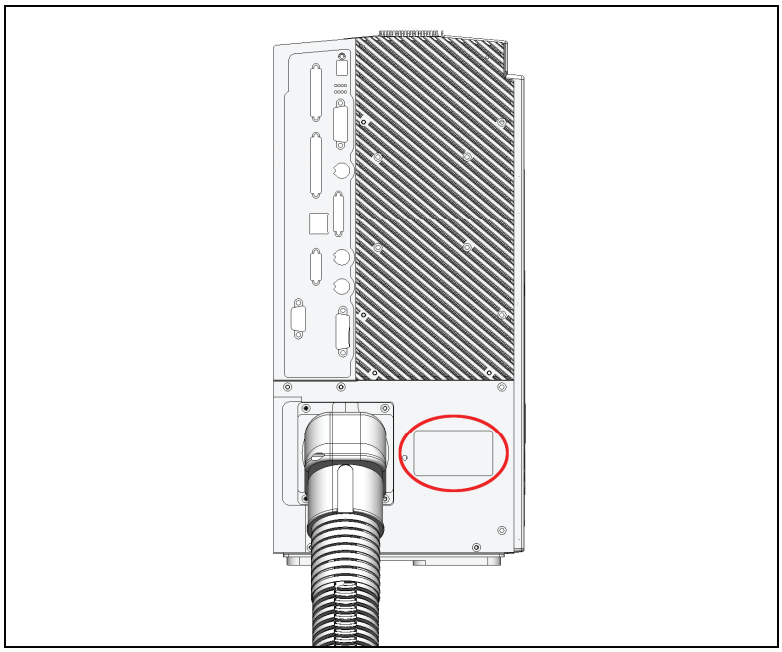


Figure 3 : Dos du scanneur, étiquette avec le numéro de série

2.7 Spécifications

2.7.1 Dimensions

2.7.1.1 TCS SP5 avec microscope inversé

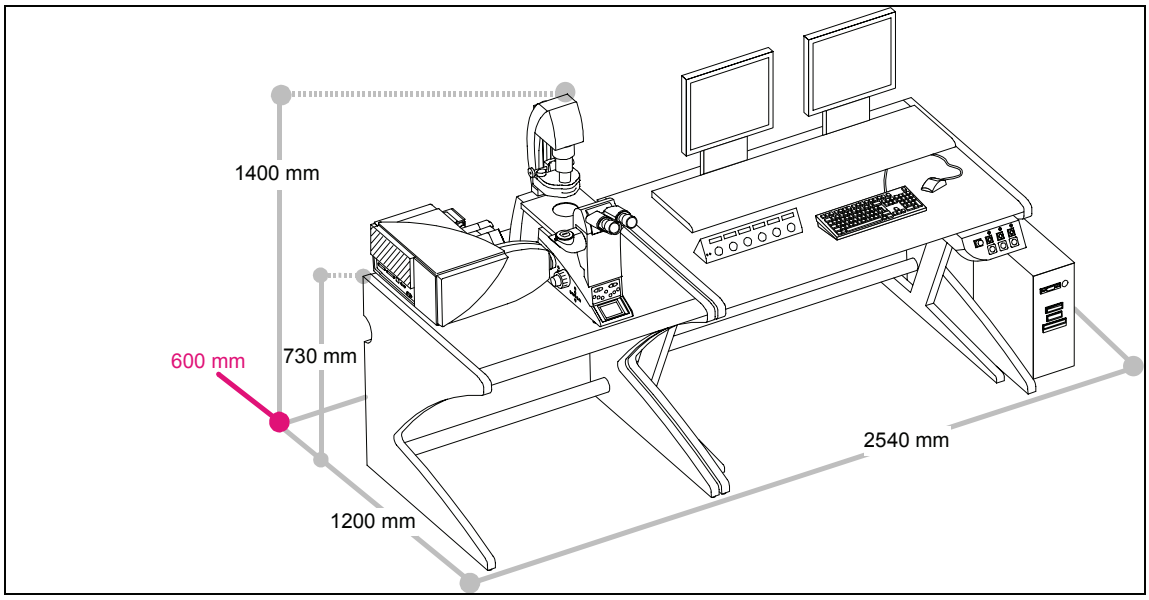


Figure 4 : Dimensions du TCS SP5 avec microscope inversé

2.7.1.2 TCS SP5 avec microscope droit

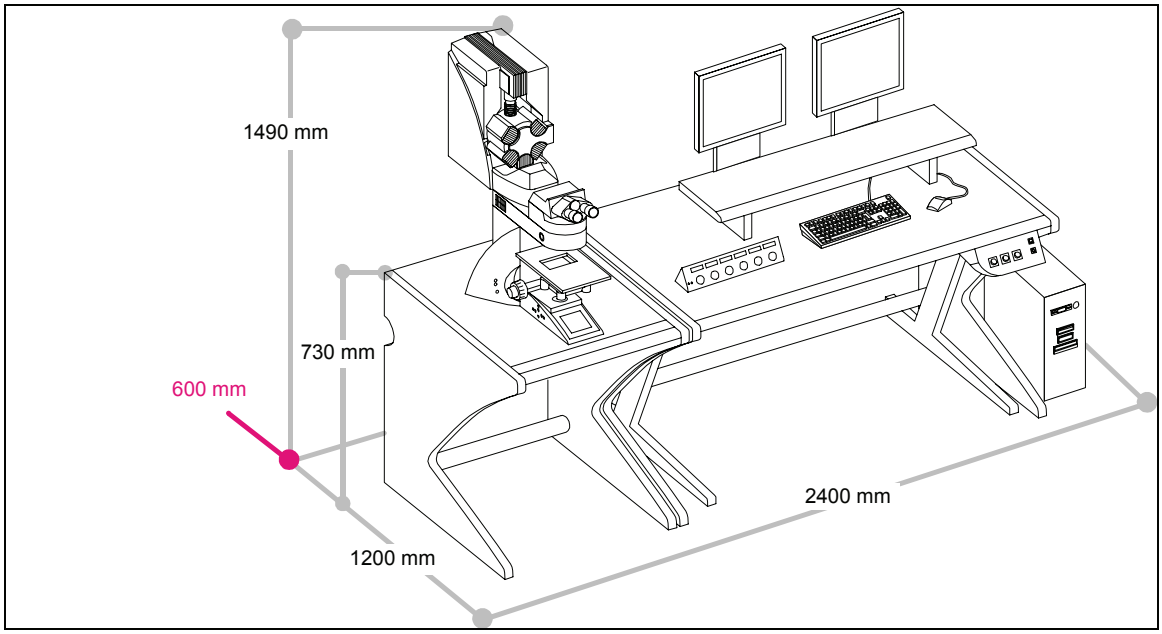


Figure 5 : Dimensions du TCS SP5 avec microscope droit

2.7.1.3 TCS SP5 X avec microscope inversé

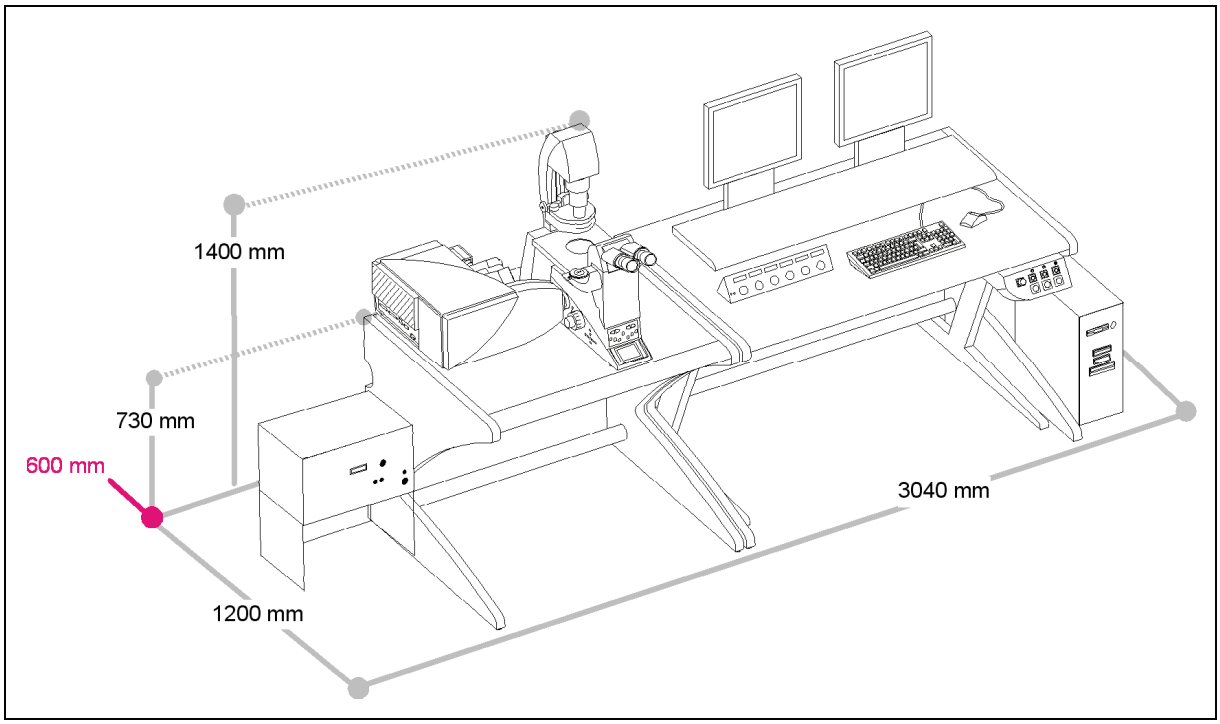


Figure 6 : Dimensions du TCS SP5 X avec microscope inversé

2.7.1.4 TCS SP5 X avec microscope droit

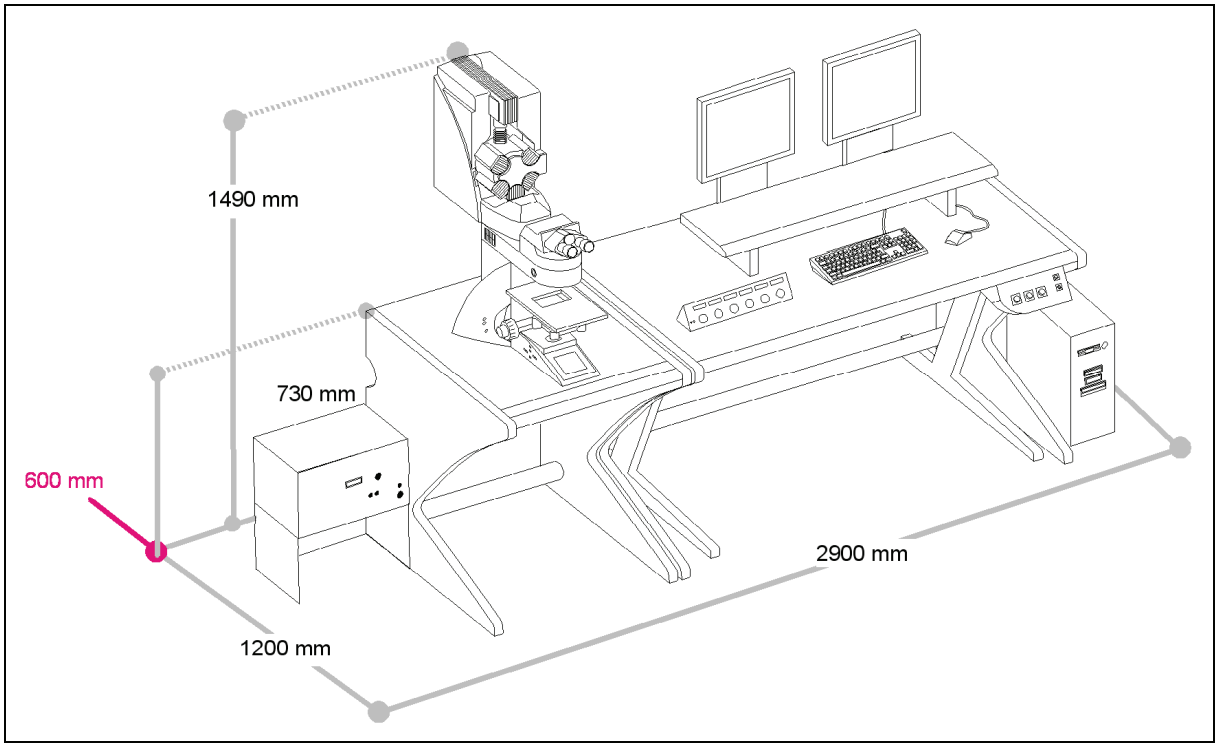


Figure 7 : Dimensions du TCS SP5 X avec microscope droit

2.7.2 Données de raccordement électrique

L'installation électrique du bâtiment doit comporter trois raccordements au secteur séparés et pourvus des protections par fusibles suivantes :

- 3 x tension secteur de 100 à 120 V, 20 A

ou

- 3 x tension secteur de 200 à 240 V, 12 - 16 A

Pour avoir des informations techniques sur les lasers placés à l'extérieur du système (tels que les lasers UV et MP), veuillez consulter la documentation fournie par le fabricant du laser.

2.7.2.1 Données de raccordement électrique de l'unité d'alimentation

Tension d'alimentation :	100 - 240 V CA ± 10 %
Fréquence :	50/60 Hz
Puissance absorbée:	3200 VA
Catégorie de surtension :	II

2.7.2.2 Données de raccordement électrique du laser à lumière blanche [1]

Tension d'alimentation :	100 - 240 V CA ± 10 %
Fréquence :	50/60 Hz
Consommation de courant :	2,2 A
Catégorie de surtension :	II
Fusibles	2 x T4A, 250 V CA

[1] Concerne seulement le système TCS SP5 X.

2.7.3 Exigences concernant le site

Ne placez jamais le système dans un endroit à courant d'air.

Veillez à ce que le système ne soit jamais installé à proximité de climatisations ou d'autres systèmes de ventilation. Réfléchissez bien à l'avance à son placement.

Veillez à ce que son environnement présente le moins de poussière possible.

Au sujet de la protection contre les poussières, veuillez lire le chapitre 11 Maintenance et entretien.

Il est conseillé d'installer le système dans des pièces obscures.

Pour l'installation, la maintenance et le transport du système, il faut prévoir des largeurs intérieures de porte de 1,00 m.

En ce qui concerne la portance minimale du sol, tenez compte du fait que le système a une charge statique de 200 kg/m².

Veillez à un environnement à l'abri de secousses.

2.7.4 Conditions ambiantes admissibles

Plage de température admissible pour le fonctionnement :	+18 à +25 °C
Plage de température requise pour un comportement optique optimal :	+22 °C ±1 °C
Humidité relative admissible :	20-80 % (sans condensation)
Vibrations admissibles : Plage de fréquence [5 Hz - 30 Hz] : Plage de fréquence [> 30 Hz] :	 < 30 µm/s (valeur effective) < 60 µm/s (valeur effective)
Degré de pollution :	Classe 2

2.7.5 Dissipation de chaleur par le système et puissance frigorifique requise

Le système TCS SP5 a une puissance consommée maximale de 3,2 kW pour le système VIS et de 6,2 kW pour le système MP.

Le TCS SP5 X a une puissance consommée maximale de 3,4 kW.

Pour avoir des informations techniques sur les lasers placés à l'extérieur du système (tels que les lasers UV et MP), veuillez consulter la documentation fournie par le fabricant du laser.

2.8 Equipement

2.8.1 Vue d'ensemble des lasers VIS/UV utilisables

Le Leica TCS SP5 contient une combinaison des lasers mentionnés ici.

Type de laser	Longueur d'onde [nm]	Rendement lumineux maximal à la sortie du laser [mW]	Rendement lumineux maximal dans le plan focal [mW]	Largeur d'impulsion
Diode 405	405	< 90	< 6	Onde continue (cw)
Diode 405 p	405	< 5 (puissance moyenne)	< 0,3 (puissance moyenne)	Pulsé, 60 ps
DPSS 442	442	< 60	< 5	Onde continue (cw)
Ar	458, 476, 488, 496, 514	< 200	< 30	Onde continue (cw)
Ar, externe	458, 476, 488, 496, 514	< 500	< 125	Onde continue (cw)
HeNe	543	< 1,5	< 0,5	Onde continue (cw)
DPSS 561	561	< 100	< 12	Onde continue (cw)
HeNe	594	< 4	< 1	Onde continue (cw)
HeNe	633	< 15	< 5	Onde continue (cw)
UV, externe (OPSL)	355	< 500	< 10	Onde continue (cw)

Tableau 1: lasers utilisables avec le TCS SP5 (sans MP)

Les composants assurant la sécurité laser ne sont installés que pour les variantes de laser citées.

2.8.2 Vue d'ensemble des lasers MP (lasers IR) utilisables

Le système MP peut en outre contenir des lasers VIS/UV (voir le tableau "Lasers VIS/UV utilisables").

2.8.2.1 Lasers picosecondes

Type de laser	Longueur d'onde [nm]	Rendement lumineux à la sortie du laser [W]	Rendement lumineux dans le plan focal [W]	Largeur d'impulsion
MaiTai ps	780 - 920	< 1,2	< 0,6	Pulsé 1,0 - 1,5 ps
MaiTai ps wideband	710 - 950	< 2,5	< 1,2	Pulsé 1,0 - 1,5 ps
MaiTai ps broadband	710 - 990	< 2,5	< 1,2	Pulsé 1,0 - 1,5 ps
MaiTai ps HP	690 - 1040	< 3,0	< 1,9	Pulsé 1,0 - 1,5 ps
Chameleon ps Ultra	690 - 1020	< 4	< 1,9	Pulsé 1,0 - 1,5 ps
Chameleon ps Ultra I	690 - 1040	< 4	< 1,9	Pulsé 1,0 - 1,5 ps
Chameleon ps Ultra II	680 - 1080	< 4	< 1,9	Pulsé 1,0 - 1,5 ps

Tableau 2: lasers MP utilisables avec le TCS SP5 et le TCS SP5 X

2.8.2.2 Lasers femtosecondes

Type de laser	Longueur d'onde [nm]	Rendement lumineux à la sortie du laser [W]	Rendement lumineux dans le plan focal [W]	Largeur d'impulsion
MaiTai fs	780 - 920	< 1,2	< 0,6	Pulsé 80 fs
MaiTai fs wideband	710 - 950	< 2,5	< 1,2	Pulsé 80 fs
MaiTai fs broadband	710 - 990	< 2,5	< 1,2	Pulsé 80 fs
MaiTai fs HP	690 - 1040	< 3,0	< 1,9	Pulsé 100 fs
Chameleon fs Ultra	690 - 1020	< 4	< 1,9	Pulsé 140 fs
Chameleon fs Ultra I	690 - 1040	< 4	< 1,9	Pulsé 140 fs
Chameleon fs Ultra II	690 - 1080	< 4	< 1,9	Pulsé 140 fs

Tableau 3: lasers MP utilisables avec le TCS SP5 et le TCS SP5 X

Les composants assurant la sécurité laser ne sont installés que pour les variantes de laser citées.

2.8.3 Vue d'ensemble des lasers VIS/UV utilisables avec le TCS SP5 X

Le Leica TCS SP5 X contient une combinaison des lasers mentionnés ici.

Type de laser	Longueur d'onde [nm]	Rendement lumineux maximal à la sortie du laser [mW]	Rendement lumineux maximal dans le plan focal [mW]	Largeur d'impulsion
Diode 405	405	< 60	< 6	Onde continue (cw)
Diode 405 p	405	< 5 (puissance moyenne)	< 0,3 (puissance moyenne)	Pulsé, 60 ps
UV, externe	355	< 500	< 10	Onde continue (cw)
Ar	458, 476, 488, 496, 514	< 200	< 30	Onde continue (cw)
488 laser solide	488	< 470	< 70	Onde continue (cw)
Laser à lumière blanche	470 – 670	< 500	< 80	pulsé

Tableau 4: Lasers utilisables avec le TCS SP5 X

Les composants assurant la sécurité laser ne sont installés que pour les variantes de laser citées.

2.8.4 À quelle classe de laser ce produit correspond-il ?

Variante de laser	Plage de longueurs d'ondes	Configuration	Classe de laser
VIS	400 - 700 nm (rayonnement laser visible)	Combinaison de lasers du chapitre 2.8.1 ou 2.8.3 (sans lasers de longueurs d'onde 350 - 400 nm)	3B / IIIb
UV	350 - 700 nm (rayonnement laser visible et invisible)	Combinaison de lasers du chapitre 2.8.1 ou 2.8.3 (lasers VIS et UV)	3B / IIIb
MP	350 - 1 050 nm (rayonnement laser visible et invisible)	Combinaison de lasers du chapitre 2.8.1 (lasers VIS/UV), chapitre 2.8.2 (laser IR) ou chapitre 2.8.3 (lasers VIS/UV)	4 / IV

2.8.5 Mesures de sécurité concernant le laser

Respectez les consignes de sécurité concernant le travail avec les appareils à laser de la classe 3B / IIIb (systèmes VIS et UV) ou de la classe 4 / IV (systèmes MP) conformément aux lois et aux réglementations en vigueur dans le pays respectif. L'exploitant est responsable du respect des prescriptions de sécurité laser.

3. Les consignes de sécurité et leur signification

DANGER
Un tel avertissement signale que vous devez observer et respecter scrupuleusement un procédé d'utilisation, un processus, une condition ou une remarque mentionné(e) dans ce mode d'emploi, sous peine de mettre votre vie en danger.

ATTENTION AUX RAYONS LASER
Un avertissement laser de ce type attire votre attention sur un processus de fonctionnement, un procédé, une condition ou une instruction qu'il est impératif d'observer et de respecter, car sinon, il y a un risque de graves blessures oculaires pour les personnes travaillant avec le système.

MISE EN GARDE CONTRE UNE TENSION ÉLECTRIQUE
Un avertissement de tension de ce type attire votre attention sur un processus de fonctionnement, un procédé, une condition ou une instruction qu'il est impératif d'observer et de respecter car sinon, il y a un risque pour l'intégrité physique et la vie des personnes travaillant avec le système.

MISE EN GARDE CONTRE DES MATIÈRES NOCIVES OU IRRITANTES
Un avertissement de ce type attire votre attention sur une substance nocive pour la santé.

ATTENTION
Une consigne de sécurité de ce type attire votre attention sur un processus de fonctionnement, un procédé, une condition ou une instruction qu'il est impératif d'observer et de respecter strictement car sinon, il y a un risque de graves dommages matériels pour le système ou de perte de données.

PORTER UNE PROTECTION OCULAIRE
Un symbole d'obligation de ce type vous signale qu'une protection oculaire appropriée est prescrite de manière obligatoire pour la mise en service et l'exploitation du système. L'exécution de ces opérations sans protection oculaire appropriée peut entraîner des blessures graves et irréversibles aux yeux.

RESPECTER LE MODE D'EMPLOI
Un symbole d'obligation de ce type vous indique que les consignes de sécurité et les instructions du mode d'emploi doivent être impérativement respectées afin d'assurer un fonctionnement sûr et parfait du système. Toutes les personnes travaillant avec le système doivent respecter le mode d'emploi et en particulier les consignes de sécurité.

Les remarques contiennent soit des informations complémentaires sur un thème déterminé soit des instructions particulières concernant le maniement du produit.

4. Consignes de sécurité générales

4.1 Classe de laser pour systèmes VIS et UV

Ce système est, conformément à la norme CEI/EN 60825-1, un appareil à laser de classe 3B/IIIb.

Evitez absolument l'irradiation des yeux ou de la peau par un rayonnement direct ! Les rayons laser peuvent causer des blessures oculaires irréparables !

4.2 Classe de laser pour systèmes MP

Ce système est, conformément à la norme CEI/EN 60825-1, un appareil à laser de classe 4/IV.

Evitez absolument l'irradiation des yeux ou de la peau par un rayonnement direct et indirect ! Les rayons laser peuvent causer des blessures oculaires et cutanées irréparables !

4.3 Quelles sont les obligations de l'exploitant ?

L'exploitant du produit est responsable du fonctionnement conforme à destination et sûr et de la maintenance du système effectuée en toute sécurité, ainsi que du respect des dispositions relatives à la sécurité qui sont en vigueur.
L'exploitant est entièrement responsable de toutes les conséquences résultant d'une utilisation du système dans d'autres buts que ceux qui sont cités dans le mode d'emploi ou l'aide en ligne.

Cet appareil à laser ne peut être utilisé que par des personnes ayant été formées à la manipulation du système et informées du potentiel de risques lié au rayonnement laser.

Conformément à la norme CEI/EN 60825-1 et aux dispositions légales en vigueur dans le pays concerné, l'exploitant est tenu de prendre les mesures de sécurité appropriées et de s'assurer de leur application.

Tous les dispositifs, verrouillages et systèmes de sécurité de l'appareil à laser doivent être en état de fonctionnement.
La désactivation ou la détérioration de ces dispositifs de sécurité ou toute intervention dans l'un de ces dispositifs de sécurité peut entraîner de graves blessures oculaires, corporelles ou des dommages matériels. Dans ce cas, Leica Microsystems CMS GmbH décline toute responsabilité.

L'exploitant est tenu de nommer un responsable de sécurité laser (Laser Safety Officer) ou un conseiller de protection laser (Laser Protection Advisor) (conformément à la norme CEI/EN 60825-1: "Sécurité des appareils à laser, partie 1 : classification des matériels, prescriptions et guide de l'utilisateur" et aux dispositions légales en vigueur dans le pays concerné).

Les réparations et interventions de service après-vente doivent être exclusivement effectuées par les techniciens de service après-vente agréés de Leica Microsystems CMS GmbH.
L'exploitant est entièrement responsable de toutes les conséquences résultant d'une ouverture, d'une maintenance non conforme ou d'une réparation du système réalisées par d'autres personnes que les techniciens agréés du service après-vente Leica.

Lors de réparations et d'interventions de service après-vente nécessitant l'ouverture d'éléments de carter, le séjour dans la pièce où se trouve le système n'est autorisé qu'aux personnes compétentes, les techniciens du service après-vente Leica.

Ne connectez aucun appareil de fabrication extérieure.
Ne peuvent être connectés au produit que les appareils électriques cités dans ce mode d'emploi. Pour toute question concernant les appareils compatibles, adressez-vous à votre agence locale de service après-vente Leica ou contactez directement Leica Microsystems CMS GmbH.

Leica Microsystems CMS GmbH n'est responsable d'aucun dommage résultant du non-respect des informations citées ci-dessus. Les informations citées ci-dessus ne modifient en aucune façon, que ce soit implicitement ou explicitement, les clauses de garantie et de responsabilité contenues dans les Conditions générales de vente de Leica Microsystems CMS GmbH.

4.4 Consignes de sécurité pour l'utilisateur

Lisez et observez les consignes de sécurité contenues dans le présent mode d'emploi et les marques de sécurité apposées sur le système. Le non-respect de ces consignes de sécurité peut entraîner des blessures corporelles graves ou des dommages considérables pour le système ainsi que la perte de données.

Cet appareil à laser est de classe 3B ou 4 (en fonction des lasers utilisés).
Cet appareil à laser ne peut être utilisé que par des personnes ayant été formées à la manipulation du système et informées du potentiel de risques lié au rayonnement laser.

Avant d'exécuter pour la première fois des opérations avec le système, commencez par lire la description correspondante de la fonction dans l'aide en ligne.
Le sommaire de l'aide en ligne donne une vue d'ensemble des fonctions individuelles.

On ne peut pas prévoir toutes les situations à risque, c'est pourquoi lors du fonctionnement du produit, il convient de procéder avec soin en faisant preuve de bon sens et de prendre toutes les mesures de sécurité appropriées qui sont en vigueur pour les lasers de classe 3B/IIIb ou les systèmes MP de classe 4/IV.

Aucune dérogation aux procédures de fonctionnement et de maintenance fixées n'est admise.
Toute dérogation a lieu exclusivement aux risques de l'utilisateur et peut le cas échéant entraîner l'extinction de la garantie.

4.5 Sécurité de fonctionnement

Cet appareil ne doit pas être utilisé en association avec des appareils servant au maintien de la vie, tels que ceux utilisés par exemple en médecine intensive.

Cet appareil doit être raccordé uniquement à une alimentation électrique équipée d'une mise à la terre.

Tout contact avec des liquides ou la pénétration de liquides dans le système doivent en principe être évités.

4.6 Charge électrique maximale du bloc multiprises de l'unité d'alimentation

La consommation de courant totale de tous les appareils connectés au bloc multiprises (Figure 8)
ne doit pas dépasser 800 VA au maximum.

Les prises sont prévues pour :

- Ordinateur de contrôle TCS
- Moniteur 1
- Moniteur 2
- Microscope

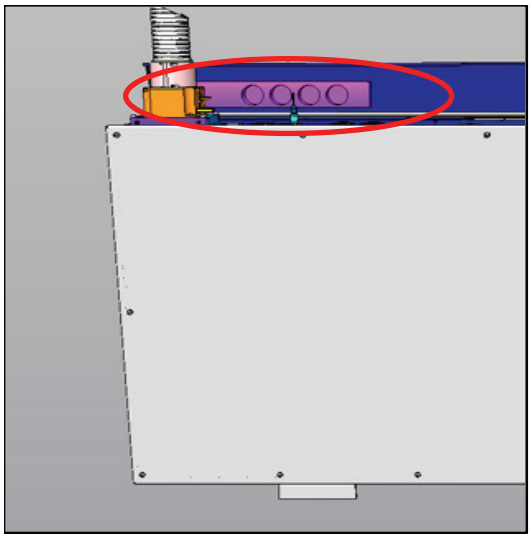


Figure 8 : Bloc multiprises, panneau arrière de l'unité d'alimentation

5. Dispositifs de sécurité

5.1 Disjoncteur

Du côté droit du panneau arrière de l'unité d'alimentation électrique, il y a un disjoncteur ("Main Circuit Breaker") qui assure par couplage la déconnexion électrique du système (Figure 9).

Le disjoncteur a à la fois la fonction de commutateur et de fusible de sûreté.

Ce disjoncteur ne sert pas à la mise sous et hors tension du système. L'unité d'alimentation électrique doit être disposée de façon à ce que le disjoncteur soit toujours librement accessible.

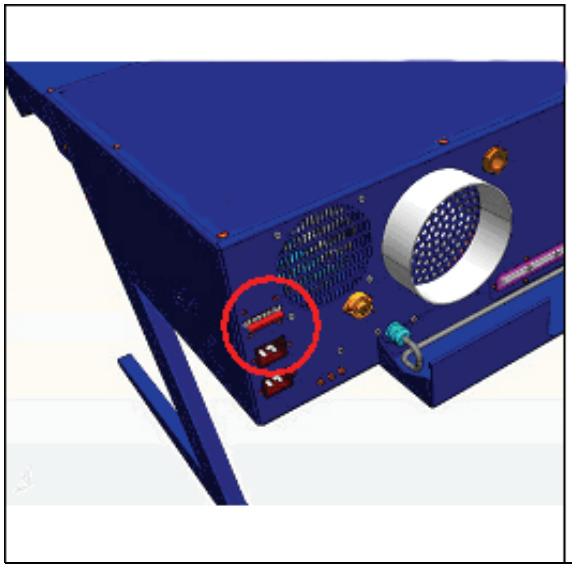


Figure 9 : Unité d'alimentation électrique avec disjoncteur

5.2 Interrupteur à clé

L'interrupteur à clé assure une protection contre toute utilisation non autorisée des appareils à laser ; il est situé sur le pupitre de commande (voir Figure 10).

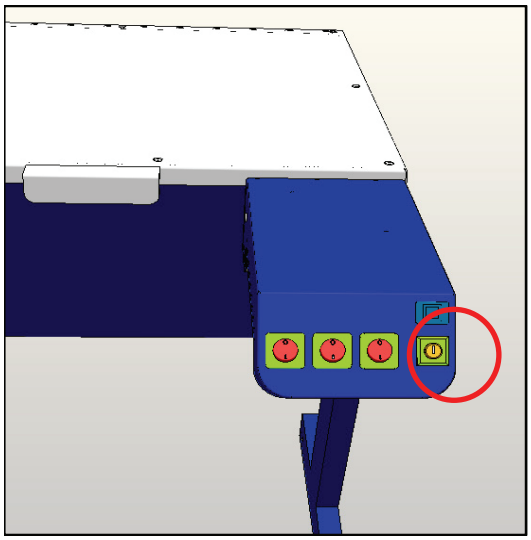


Figure 10 : Interrupteur à clé pour les lasers internes

L'interrupteur à clé assure une protection contre toute utilisation non autorisée du laser externe à lumière blanche ; il est situé en façade du laser à lumière blanche (voir Figure 11).

Figure 11 : Interrupteur à clé du laser à lumière blanche

L'interrupteur à clé assure une protection contre toute utilisation non autorisée du laser externe UV ; il est situé en façade du bloc d'alimentation (voir Figure 12).

Figure 12 : Interrupteur à clé du laser externe UV

Pour les autres lasers externes, la position des interrupteurs à clé est indiquée dans le mode d'emploi fourni par le constructeur du laser.

5.3 Voyants indicateurs d'émission laser

L'état de service des lasers situés dans l'unité d'alimentation électrique est signalé par un voyant indicateur d'émission (Figure 13). Le voyant indicateur d'émission laser est situé au-dessus de l'interrupteur à clé ; quand il est actif, il brille en jaune.

Le voyant indicateur d'émission laser du laser à lumière blanche est situé en façade du laser (voir Figure 14) ; il est rouge quand il est allumé.

Dès que le voyant indicateur d'émission laser est allumé, c'est l'indication fonctionnelle qu'il peut y avoir un rayonnement laser au niveau de l'échantillon.

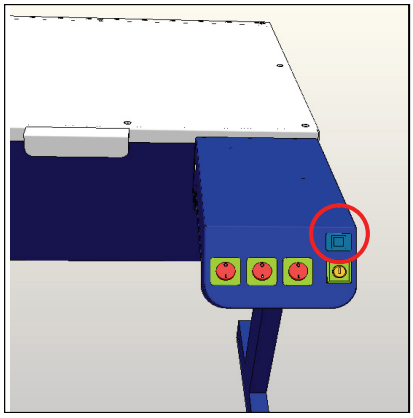


Figure 13 : Voyants indicateurs d'émission laser sur le pupitre de commande

Figure 14 : Voyant indicateur d'émission laser du laser à lumière blanche

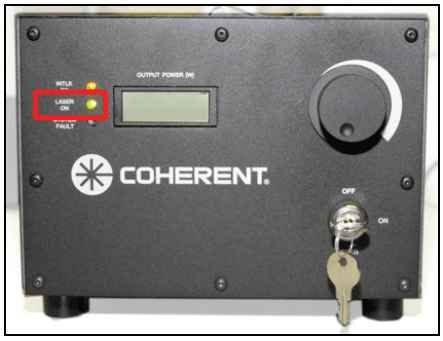


Figure 15 : Voyant indicateur d'émission laser sur le bloc d'alimentation du laser externe UV

Le système doit être séparé immédiatement de l'alimentation électrique si :

- le voyant indicateur d'émission laser ne s'allume pas après une mise sous tension réalisée au moyen de l'interrupteur à clé
- ou s'il continue à briller après une mise hors tension réalisée au moyen de l'interrupteur à clé,
- ou si après une mise sous tension réglementaire, le balayage de l'échantillon (faisceau laser au niveau de l'échantillon) ne commence pas.

Dans un cas comme dans l'autre, il faut informer immédiatement le service après-vente Leica !

Pour les autres lasers externes, la position du voyant indicateur d'émission laser est indiquée dans le mode d'emploi fourni par le constructeur du laser.

5.4 Prise de verrouillage à distance (Interlock) sur l'unité d'alimentation électrique

Sur le panneau arrière de l'unité d'alimentation se trouve la prise du verrouillage à distance "Interlock" (tension nominale 12 V CC, Figure 16).

A cette prise est relié le connecteur de verrouillage à distance comportant un shunt.

Il est aussi possible de connecter des dispositifs de verrouillage à distance associés au local, à la porte ou à d'autres verrouillages de sécurité qui sont fixes. Si le contact est ouvert, le trajet du faisceau laser est interrompu.

La longueur totale de la conduction entre les deux broches du connecteur de verrouillage à distance ne doit pas dépasser 10 m.

Figure 16 : Prise de verrouillage à distance (Interlock) sur l'unité d'alimentation électrique

5.5 Prise de verrouillage à distance sur le laser à lumière blanche [2]

Le panneau arrière du laser à lumière blanche comporte la prise de verrouillage à distance ”Interlock” (tension nominale 12 V CC, voir Figure 17) :

Si le laser à lumière blanche fonctionne comme composant du système TSC SP5 X, vous devez utiliser la prise de verrouillage à distance située sur l'unité d'alimentation (voir le chapitre 5.4) ! Le connecteur de verrouillage à distance (pontage de court-circuit) doit être branché sur la prise de verrouillage à distance du laser à lumière blanche.

Si vous faites fonctionner séparément le laser à lumière blanche (sans le connecter au système TCS SP5), vous devez utiliser la prise de verrouillage à distance située sur le laser à lumière blanche (voir Figure 17) comme port des verrouillages à distance !

Il est aussi possible de connecter des dispositifs de verrouillage à distance associés au local, à la porte ou à d'autres verrouillages de sécurité qui sont fixes. Si le contact est ouvert, le trajet du faisceau laser est interrompu.

[2] Concerne seulement le système TCS SP5 X

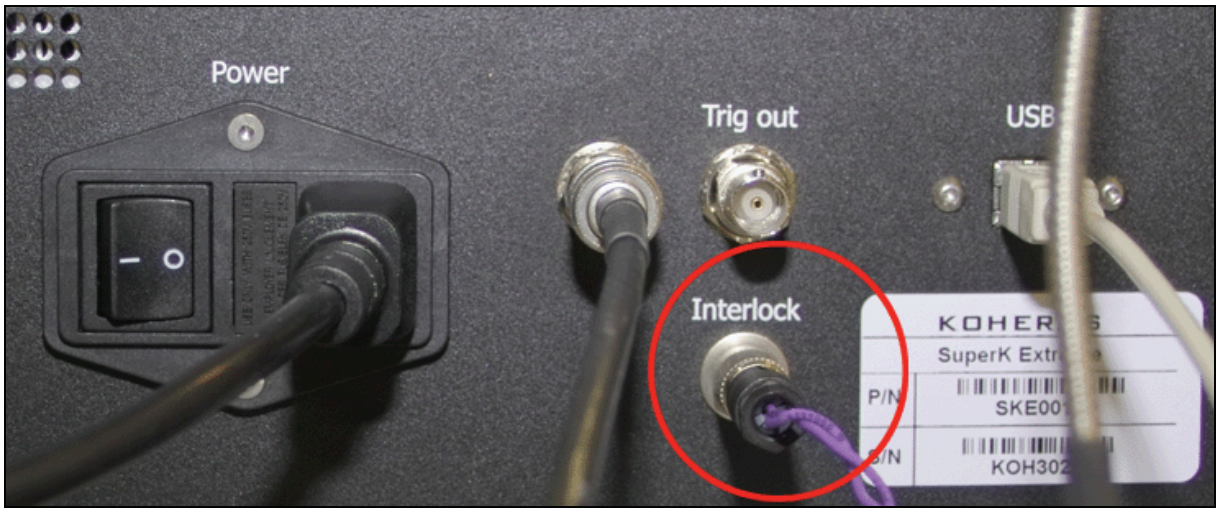


Figure 17 : Prise de verrouillage à distance (Interlock) sur le laser à lumière blanche

5.6 Prise de verrouillage à distance sur les lasers externes

Pour les lasers externes, veuillez consulter le mode d'emploi fourni par le fabricant du laser pour connaître la position de la prise de verrouillage à distance.

5.7 Prise de verrouillage à distance (Interlock) sur le scanneur

Sur le panneau arrière du scanneur, se trouve la prise Interlock (tension nominale : 12 V CC, Figure 18).

Pour des raisons de sécurité laser, il ne faut connecter à cette prise que le microscope inversé ou, en cas d'utilisation d'un microscope droit, le boîtier à miroir. Cela garantit que l'interrupteur de sécurité du microscope fait partie du circuit Interlock.

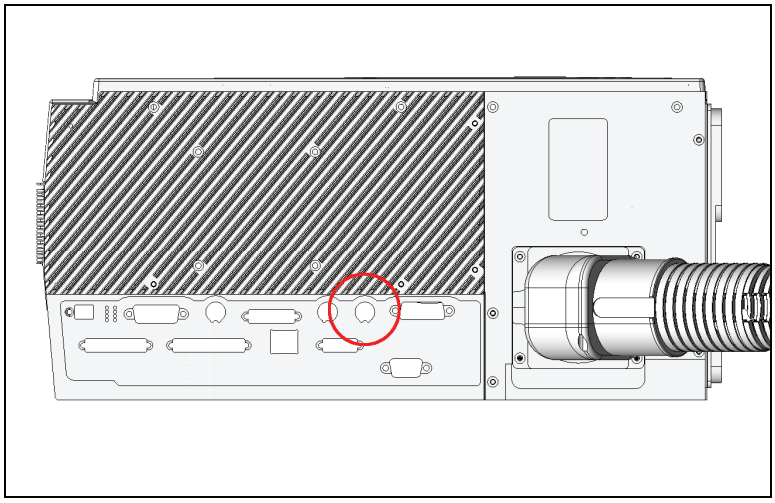


Figure 18 : Position de la prise Interlock

5.8 Fonction et position des interrupteurs de sécurité

Si l'interrupteur de sécurité se détache, le trajet lumineux du faisceau laser est interrompu.

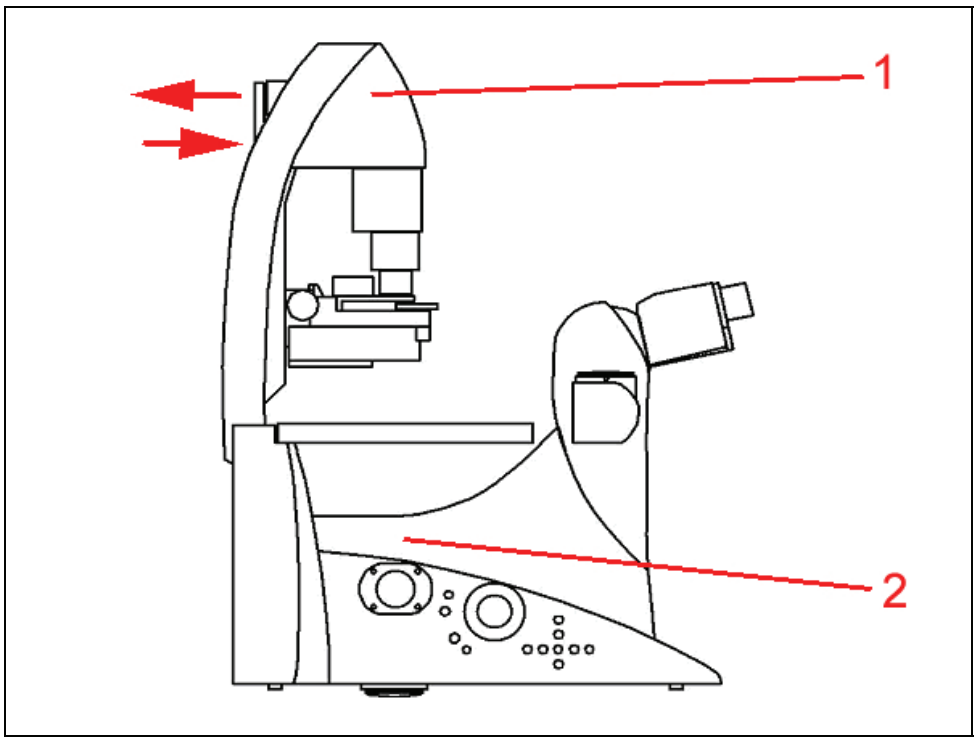


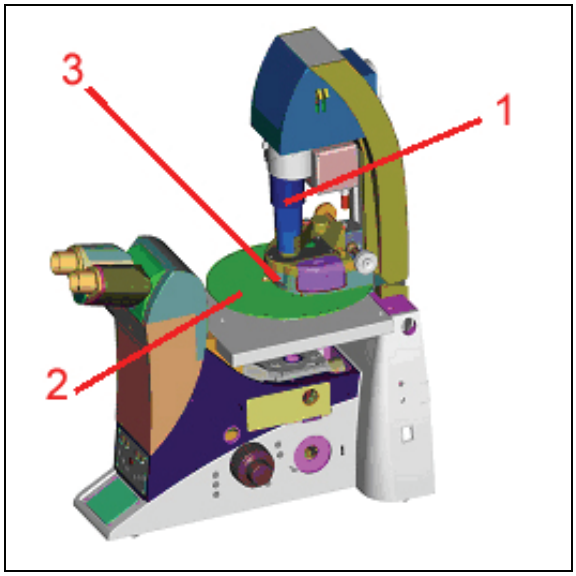
Figure 19 : Position de l'interrupteur de sécurité du bras d'éclairage diascopique (1) et commutation du balayage à l'oculaire (2)

Position	Est activé par	Type de microscope	Est activé si	Fonction
1	Bras d'éclairage diascopique	Microscope inversé DMI 6000 CS	Le bras d'éclairage est basculé (p. ex. pour travailler sur l'échantillon).	Bloque la lumière du laser pendant le travail sur l'échantillon.
2	Commutation motorisée entre le balayage et l'oculaire	Microscope inversé DMI 6000 CS	Pivotement motorisé du miroir de renvoi vers le scanneur.	Bloque la lumière parasite quand l'utilisateur passe de l'observation confocale à l'observation par l'oculaire.

5.9 Dispositifs spéciaux concernant la sécurité laser

5.9.1 Gaine de protection laser et capteur de faisceau

Le guidage de sécurité du faisceau et le capteur de faisceau sont intégrés aux microscopes inversés pour la protection contre le rayonnement laser et se trouvent entre la base du condenseur et le détecteur de diascopie (voir Figure 20).



1 Gaine de protection laser
(laser protection tube)

2 Capteur de faisceau
(cette figure montre le capteur de faisceau associé au système MP)

3 Base du condenseur

Figure 20 : Microscope inversé

Si vous commandez ultérieurement une base de condenseur (Figure 20, position 3), sachez que la base de condenseur est livrée sans le capteur de faisceau (Figure 20, position 2).
Vous devez en tout cas remonter le capteur de faisceau (Figure 20, position 2) existant. Suivez les instructions contenues dans le mode d'emploi livré avec le microscope.

En cas d'utilisation d'une base de condenseur avec porte-filtre, il faut toujours veiller à faire pivoter les porte-filtres inutilisés hors du trajet optique et à couvrir le trajet optique avec la gaine de protection laser.
L'équipement de porte-filtres avec des filtres doit se faire de bas en haut de sorte que la gaine de protection laser couvre le plus possible le trajet optique. Il ne faut pas faire pivoter les filtres pendant le balayage.

5.9.2 Protection avec les systèmes MP (lasers IR)

La lumière de tous les lasers VIS (plage de longueurs d'ondes 400 - 700 nm, spectre visible) et lasers UV (plage de longueurs d'ondes < 400 nm, invisible) installés est conduite par un câble à fibres optiques qui assure une protection intégrale jusqu'à ce que la lumière quitte l'objectif du microscope et atteigne l'échantillon.

Avec les systèmes équipés de laser à infrarouge (plage de longueurs d'ondes > 700 nm), le faisceau est conduit par le guidage de sécurité du faisceau et le cas échéant, également par un câble à fibres optiques (Figure 21). Ainsi, la protection contre le faisceau laser est totale jusqu'à ce qu'il quitte l'objectif du microscope et atteigne la préparation.

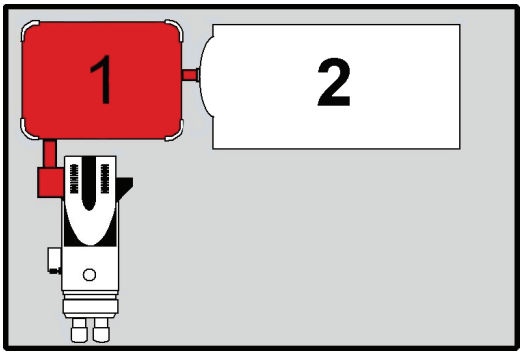


Figure 21 : Guidage de sécurité du faisceau (1) et laser IR (2)

5.10 Marques de sécurité sur le système

Les marques de sécurité, en anglais ou en allemand, sont choisies en fonction de la configuration laser (VIS, UV, MP). Elles sont apposées aux endroits décrits ci-après.

5.10.1 Microscope inversé DMI 6000 CS

Vue oblique arrière sur le côté droit du microscope :

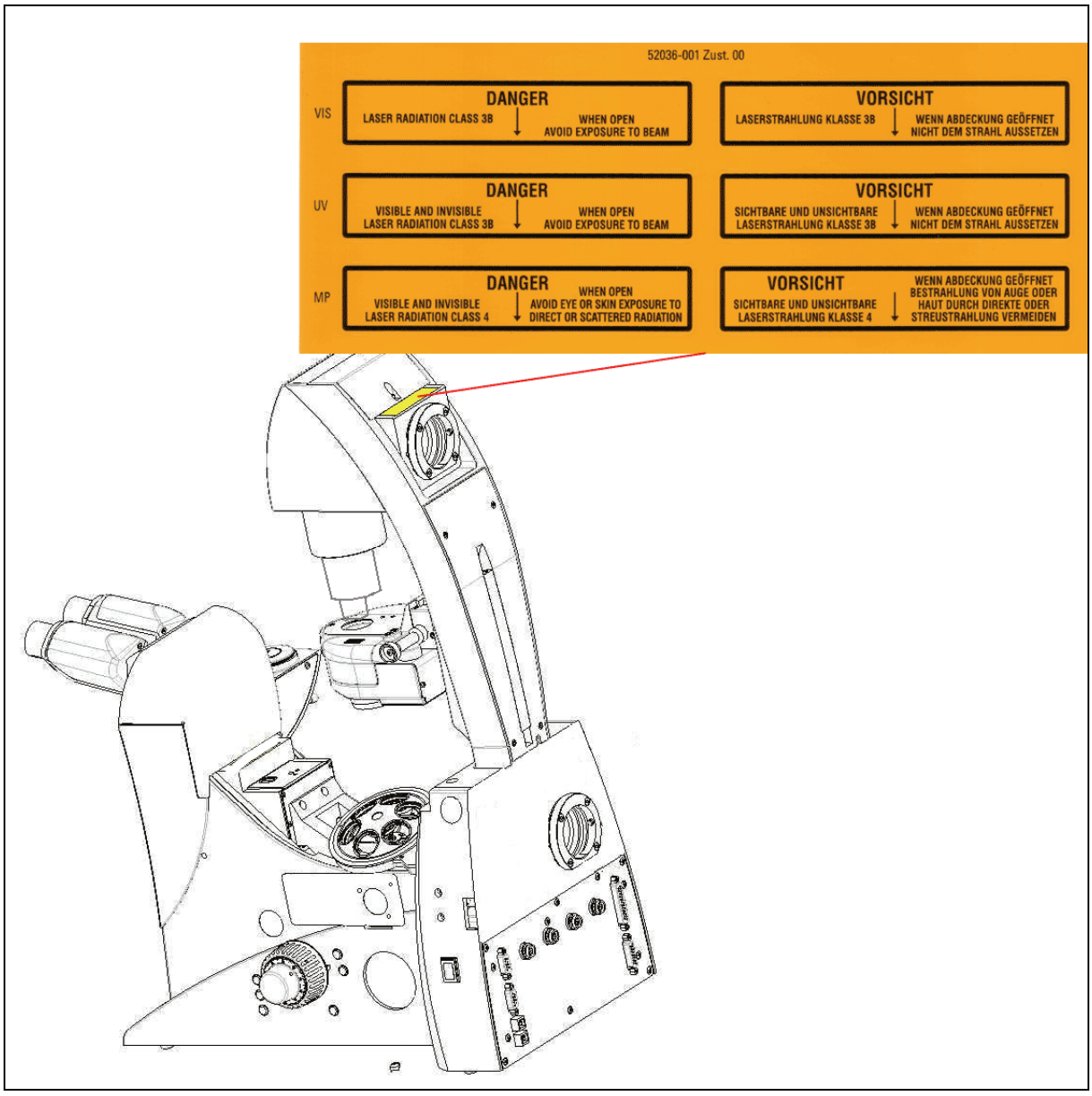


Figure 22 : Autocollant de sécurité pour microscope inversé DMI 6000 CS

Vue oblique avant sur le côté droit du microscope :

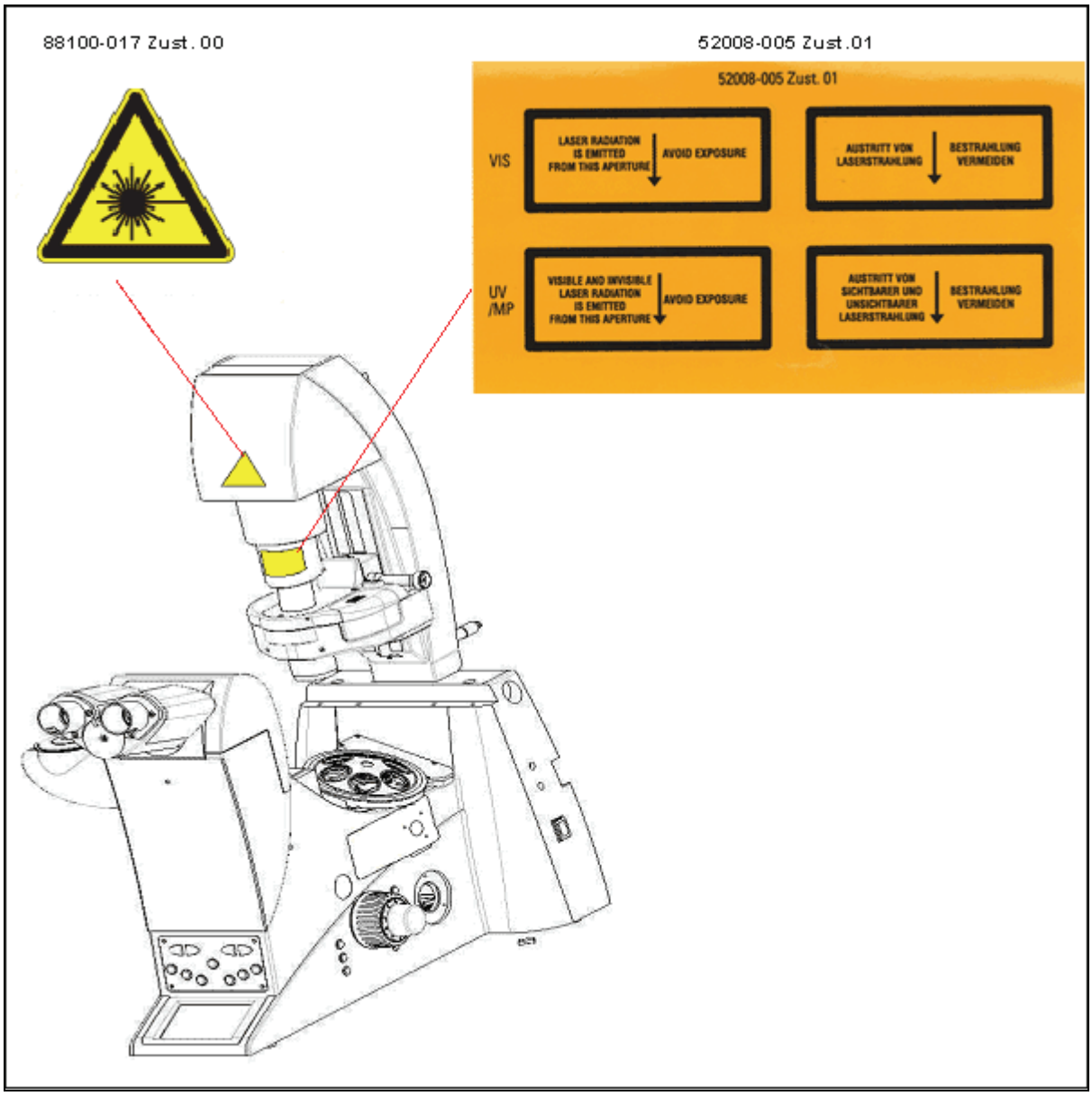


Figure 23 : Autocollant de sécurité pour microscope inversé DMI 6000 CS

5.10.2 Microscope droit DM 5000/6000 CS

Vue oblique avant sur le côté droit du microscope :

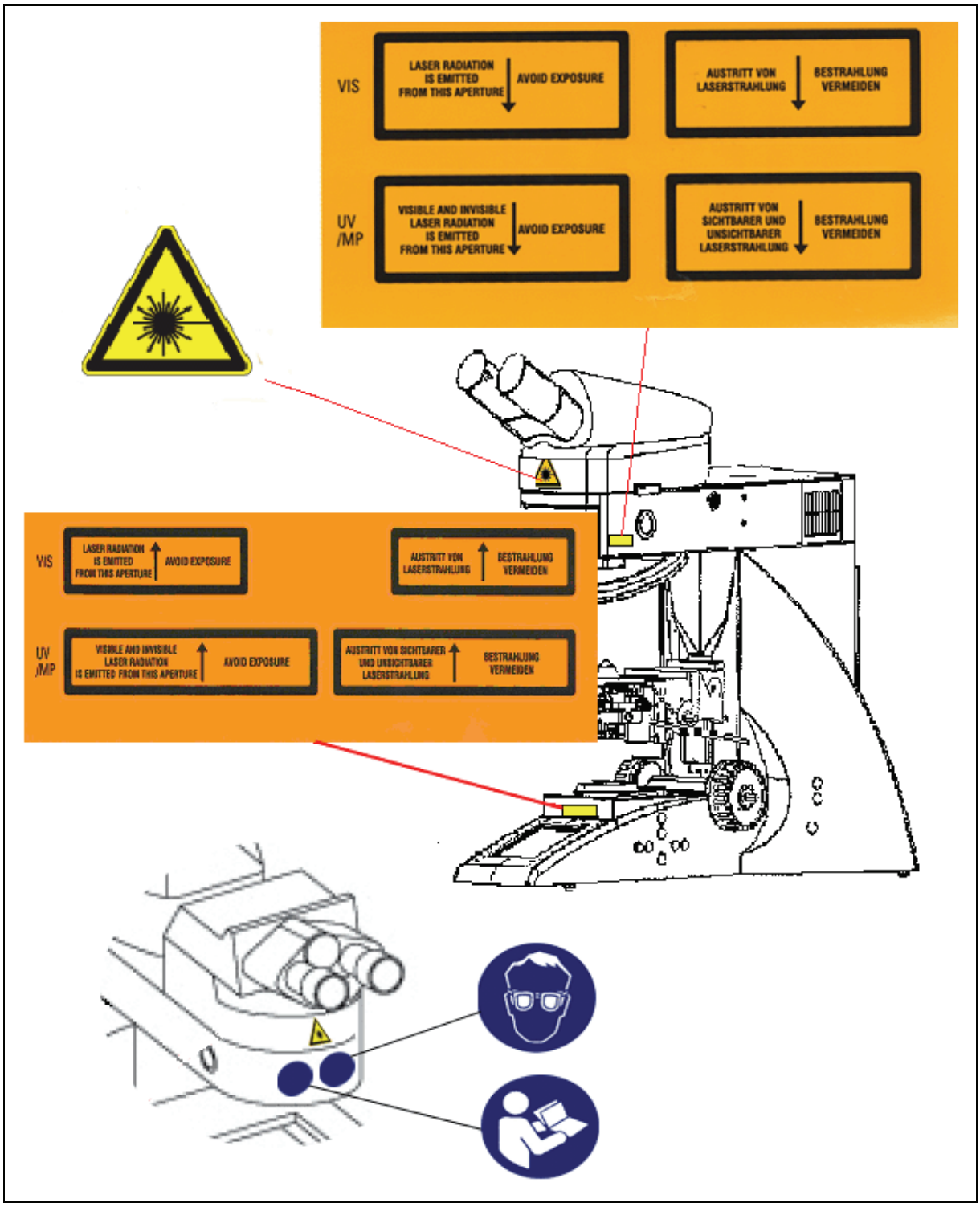


Figure 24 : Autocollant de sécurité pour microscope droit DM 5000/6000 CS

Vue arrière du microscope :

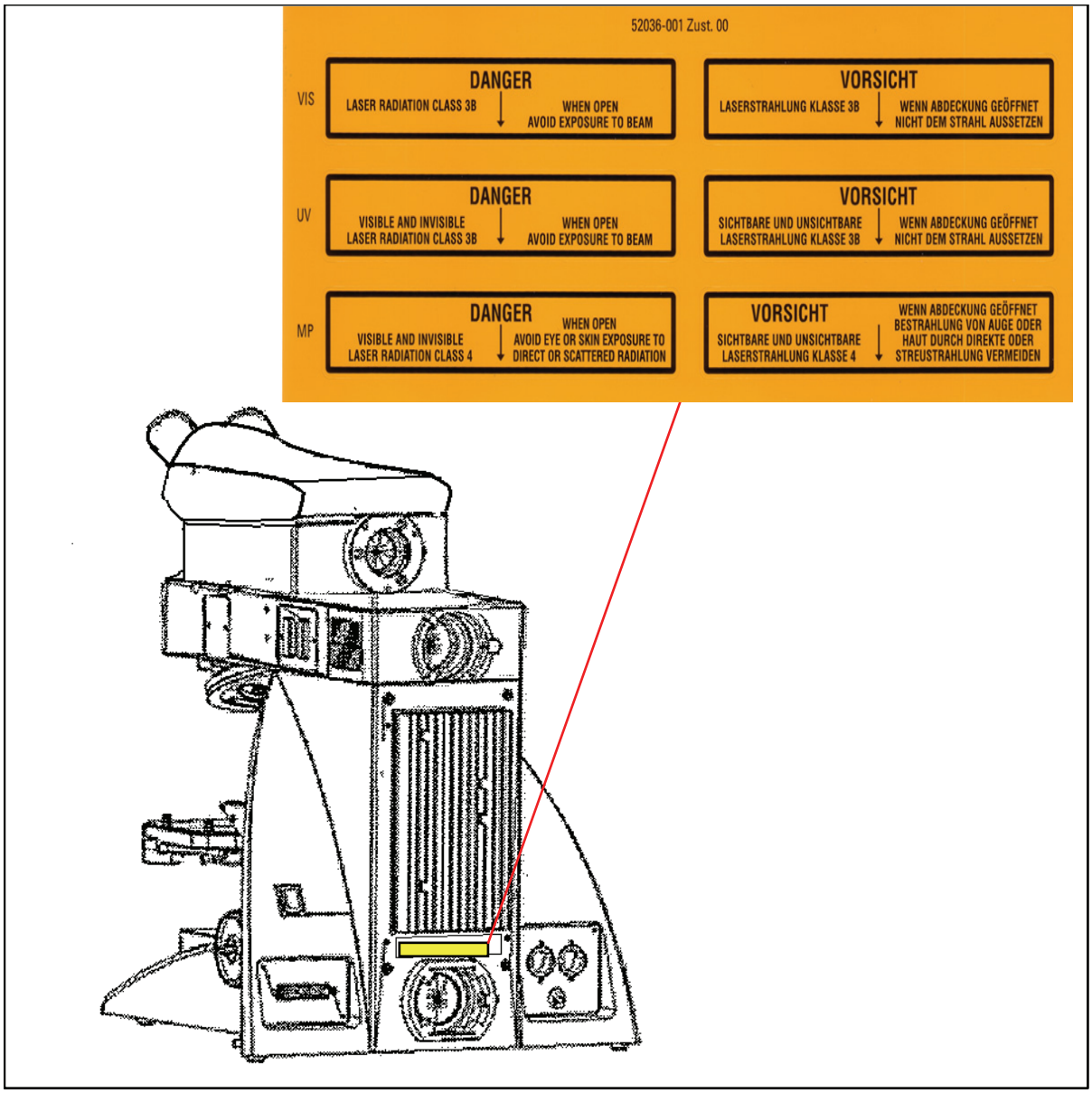


Figure 25 : Autocollant de sécurité pour microscope droit DM 5000/6000 CS

5.10.3 Tête de balayage

Vue oblique avant sur le côté gauche de la tête de balayage :

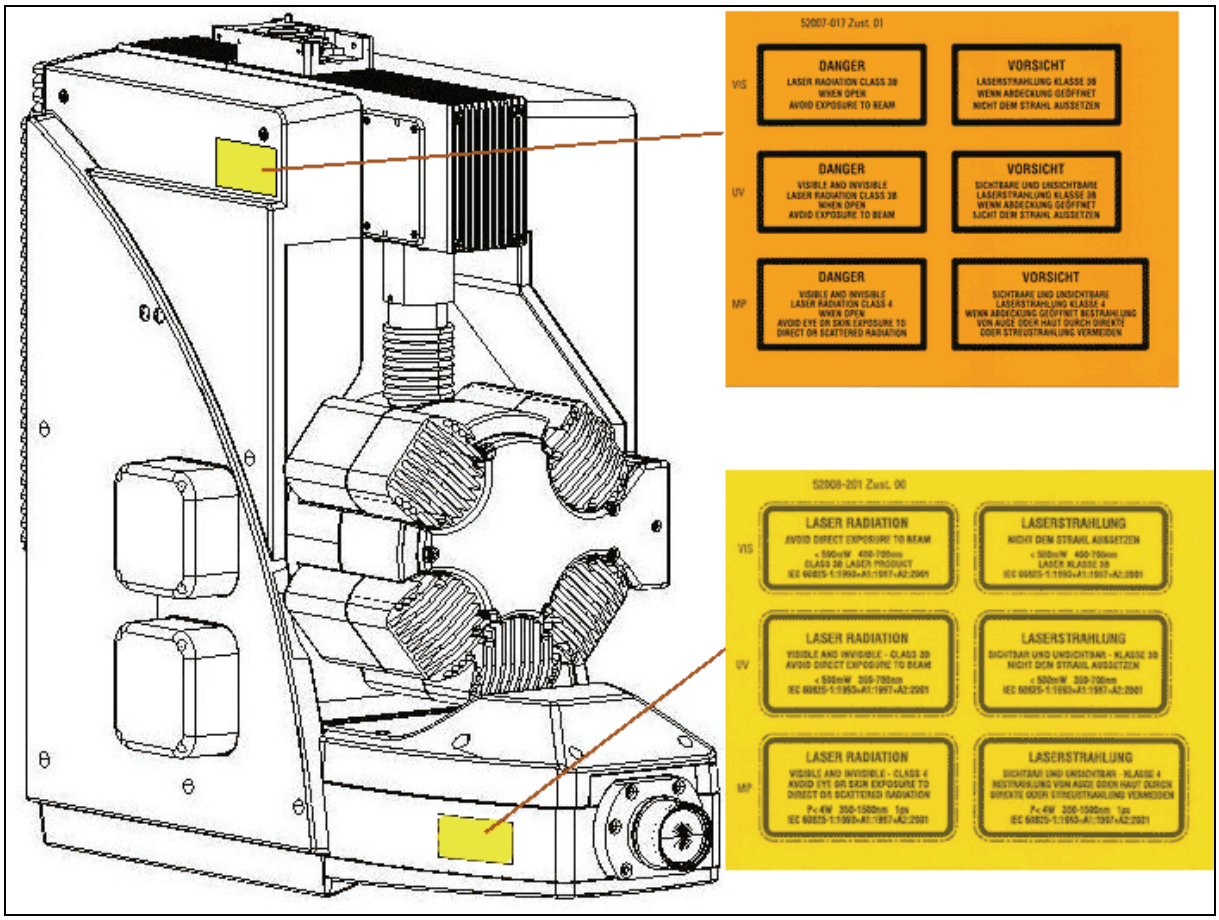


Figure 26 : Autocollant de sécurité pour le scanneur

5.10.4 Laser à lumière blanche [3]

Panneau arrière du laser à lumière blanche :

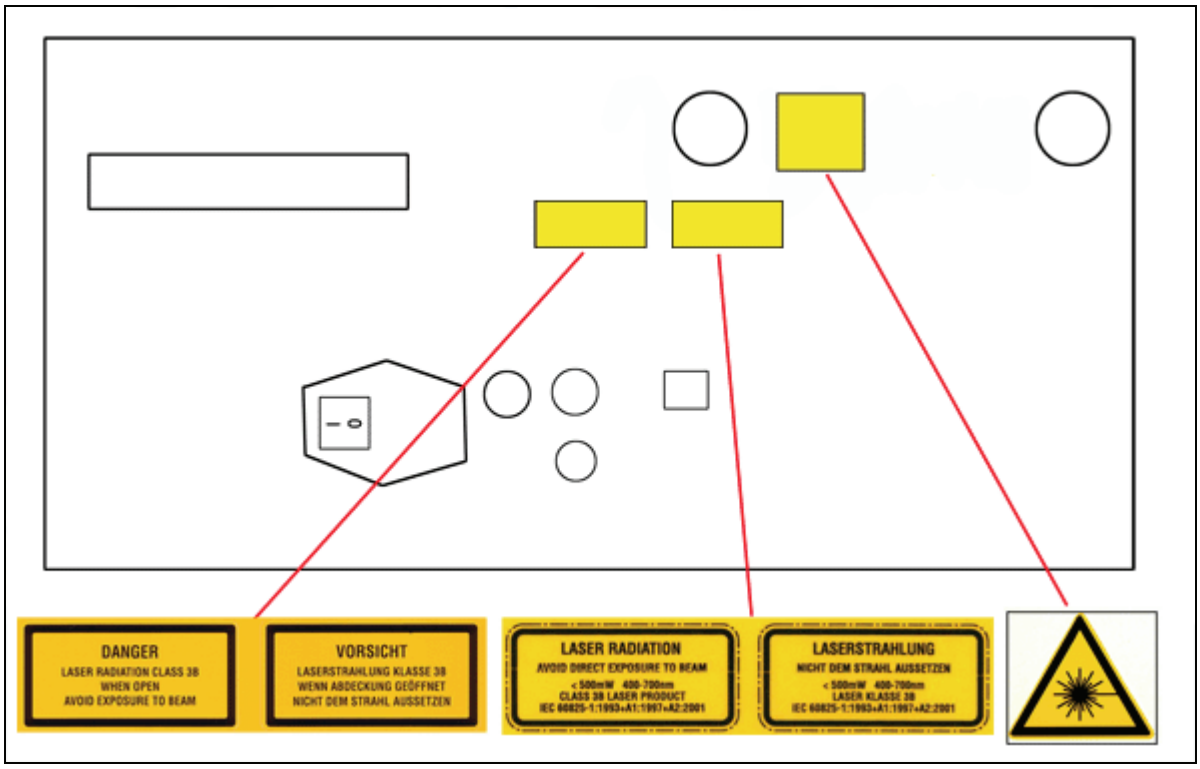


Figure 27 : Autocollant de sécurité sur le panneau arrière du laser à lumière blanche

[3] Concerne seulement le système TCS SP5 X.

5.10.5 Laser externe UV[4]

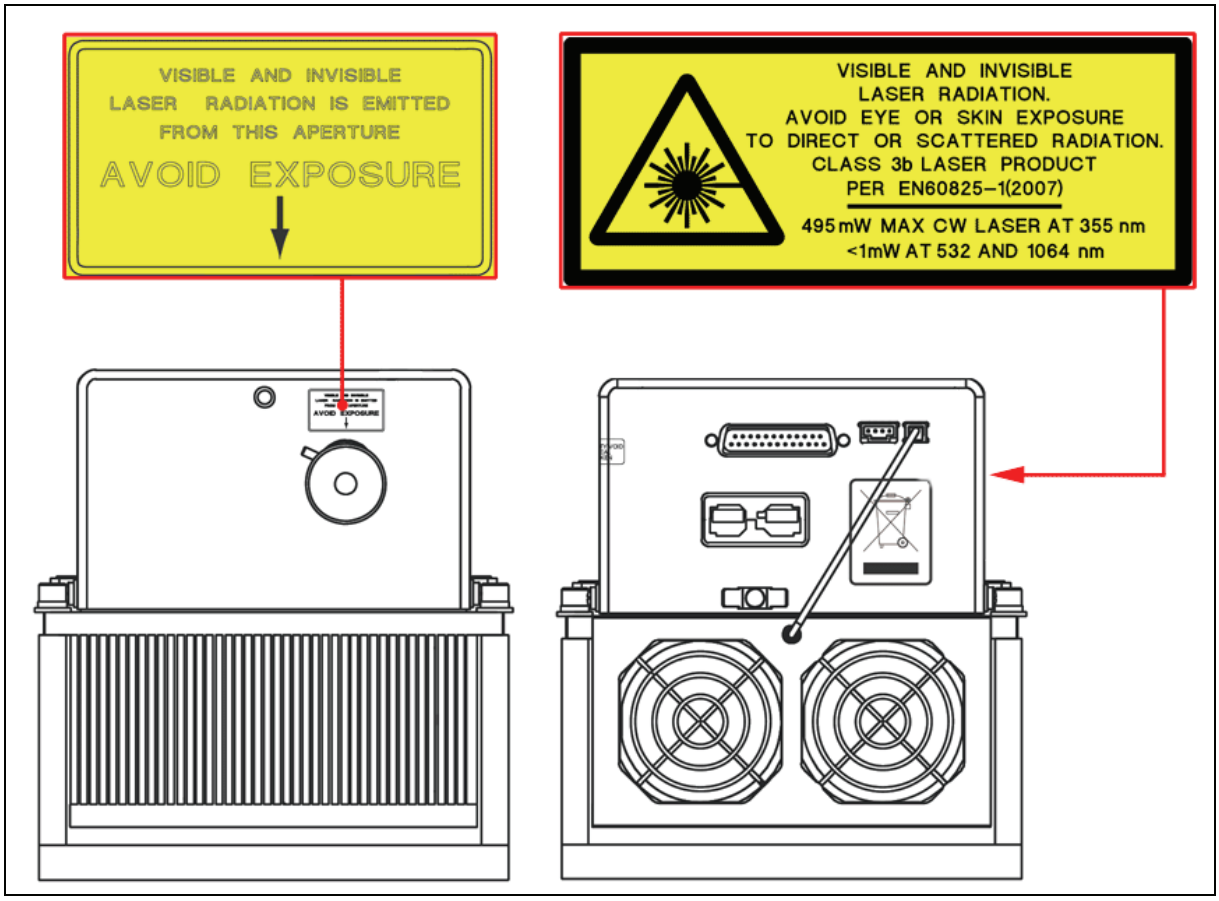


Figure 28 : Autocollant de sécurité sur le laser externe UV

[4] Concerne uniquement les systèmes avec un laser externe UV.

5.10.6 Unité d'alimentation électrique

Vue de l'unité d'alimentation électrique :

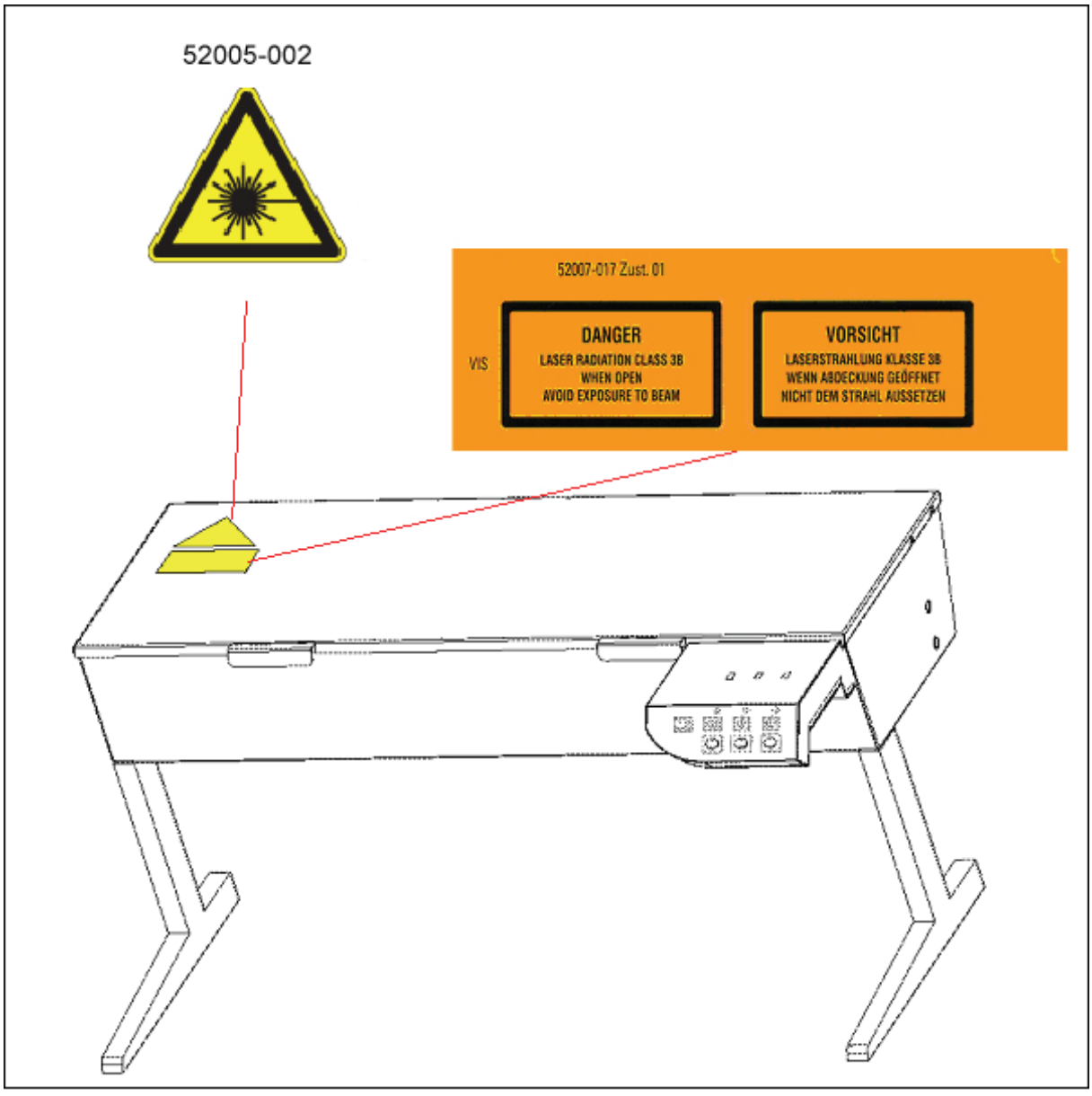


Figure 29 : Autocollant de sécurité pour l'unité d'alimentation TCS SP 5 (vue avant)

5.10.7 Unité de couplage de faisceau MP

Vue oblique avant sur le côté droit de l'unité de couplage de faisceau MP :

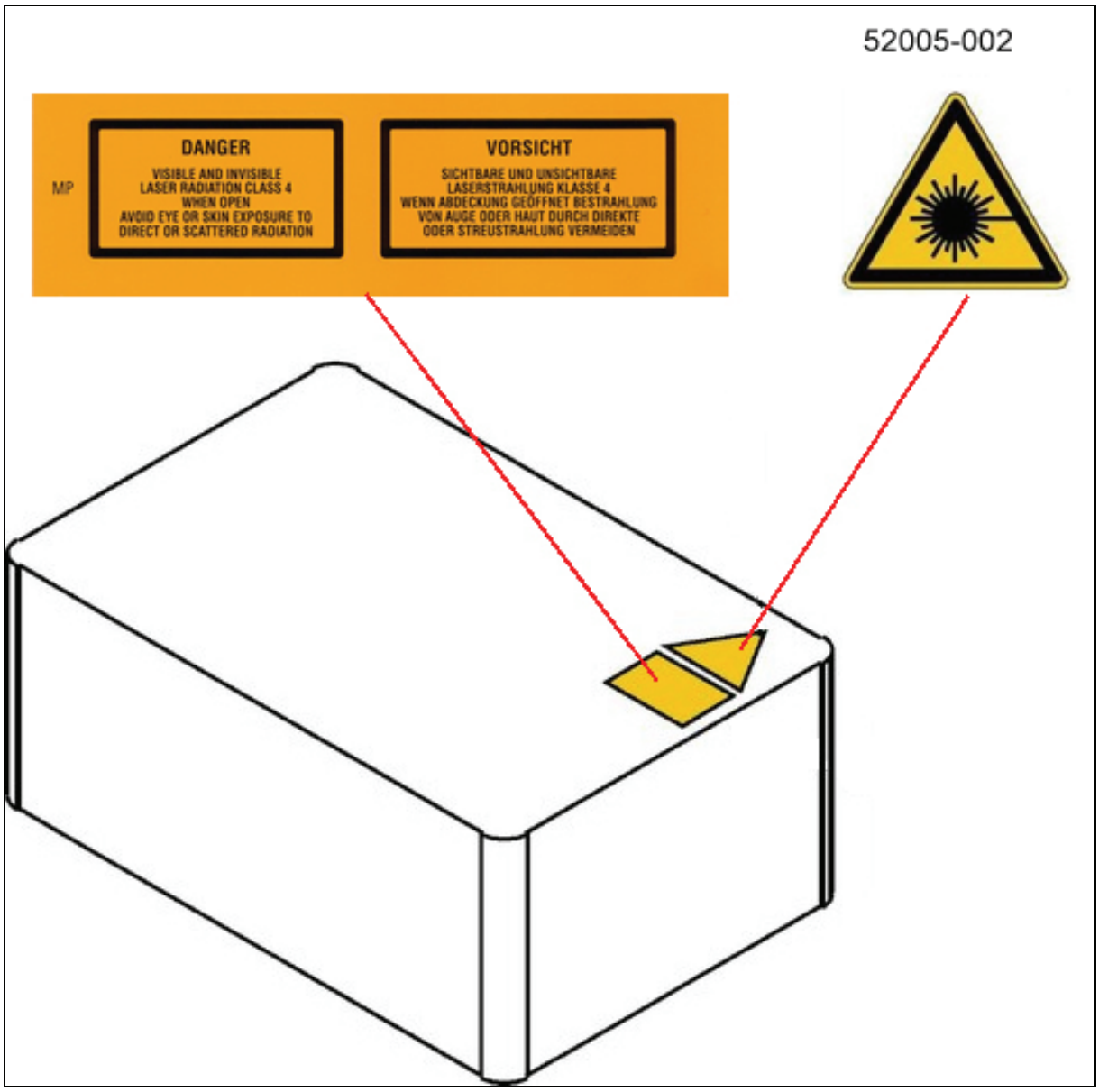


Figure 30 : Autocollant de sécurité pour l'unité de couplage de faisceau MP (dessus)

5.10.8 Cache (pour bride de rechange)

Vue avant sur le cache:

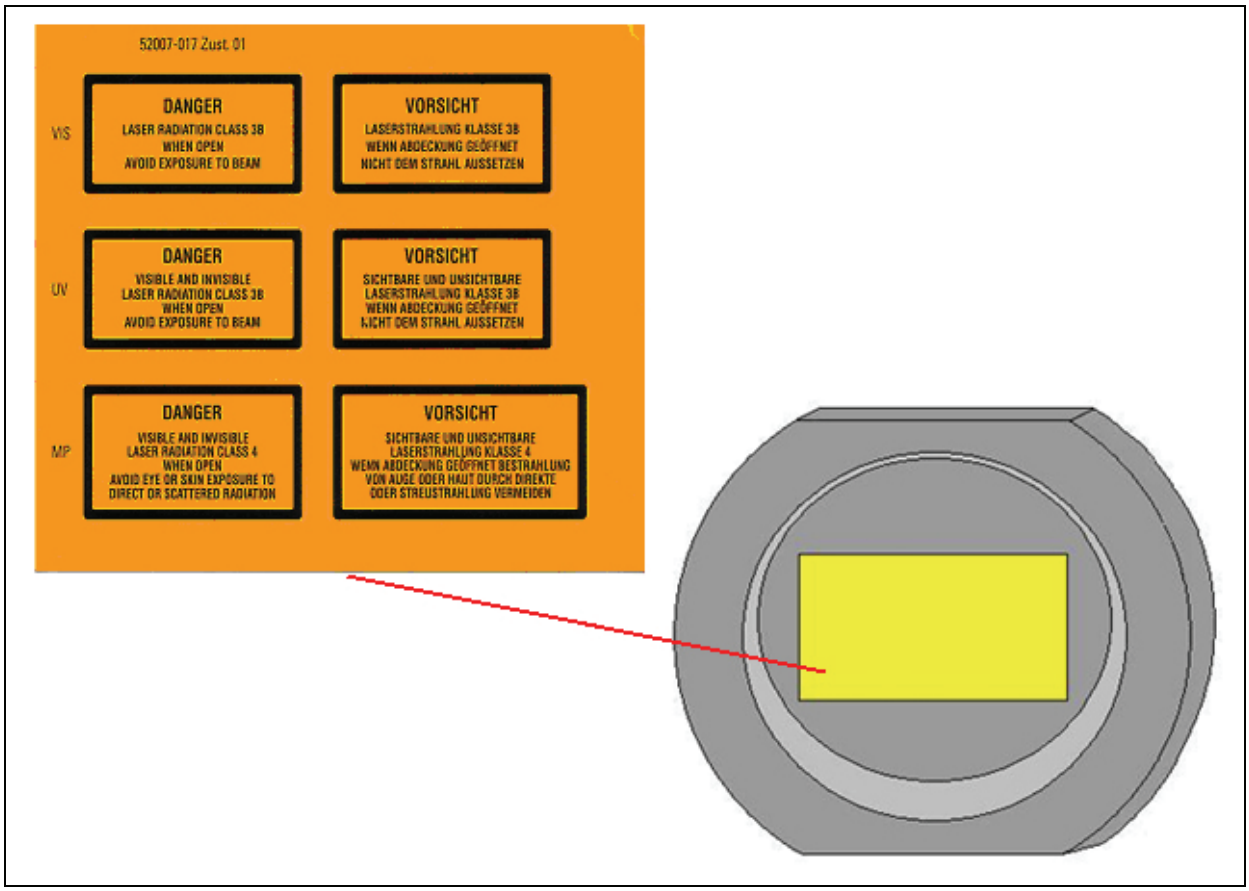


Figure 31 : Cache pour bride de rechange

Si la bride de rechange pour la diascopie n'est pas équipée d'un sous-ensemble fonctionnel (module d'éclairage, par exemple), l'orifice doit être fermé avec un cache en raison de la sécurité laser.

5.10.9 Boîtier à miroir

Vue avant sur le boîtier de miroir :

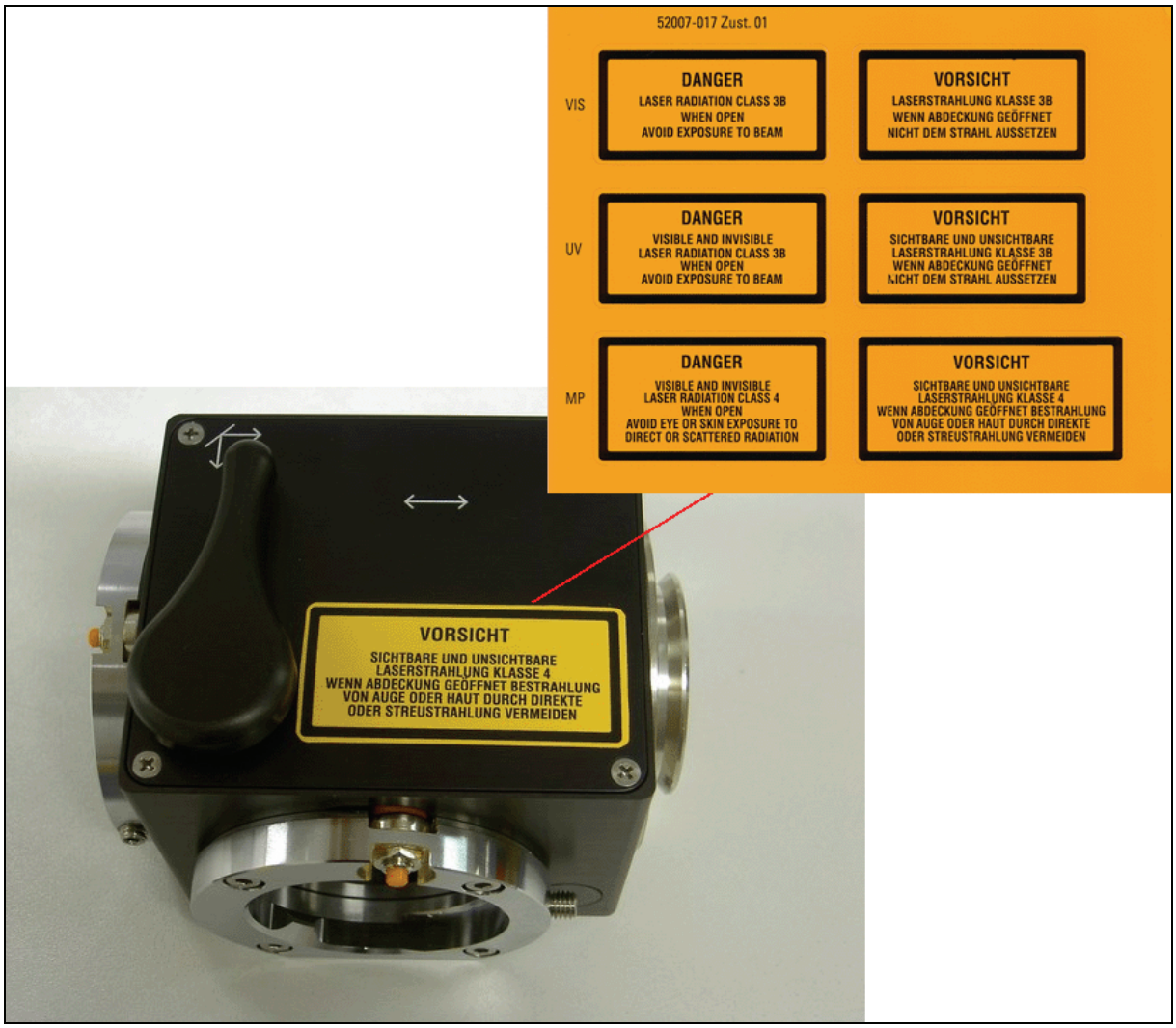


Figure 32 : Autocollant de sécurité pour le boîtier de miroir (dessus)

6. Consignes de sécurité concernant l'exploitation du système

6.1 Exigences concernant le lieu d'installation/lieu de stockage

Cet appareil a été conçu pour une utilisation dans les laboratoires et il ne doit pas être utilisé en association avec des appareils servant au maintien de la vie, tels que ceux utilisés par exemple en médecine intensive.

Cet appareil a été conçu pour être connecté à une prise mise à la terre. La prise mise à la terre est une fonction de sécurité importante.
Pour éviter les risques tels que les chocs électriques ou les dommages matériels, cette fonction ne doit pas être désactivée.

Pour éviter les risques tels que les incendies et les chocs électriques, l'appareil ne doit jamais être exposé à la pluie ou à l'humidité.
N'ouvrez le carter en aucun cas. Il ne doit jamais y avoir pénétration de liquides dans
le carter du système et les composants électriques ne doivent pas entrer en contact avec des liquides. L'appareil doit être complètement sec avant un branchement sur l'alimentation électrique ou une mise sous tension.

6.2 Consignes de sécurité générales relatives à l'exploitation

Ne regardez pas dans les oculaires pendant le balayage.

Ne regardez pas dans les oculaires pendant la commutation de trajet optique sur le microscope.

Ne regardez jamais directement un faisceau laser ou une réflexion de faisceau laser. Evitez tout contact avec le faisceau laser.

Ne désactivez jamais les dispositifs de protection contre les rayons laser. Lisez intégralement le chapitre "Dispositifs concernant la sécurité laser" pour vous familiariser avec les dispositifs de sécurité du système.

Ne placez aucun objet réfléchissant dans le trajet optique.

Observez impérativement le mode d'emploi du microscope joint à la livraison.

6.3 Protection oculaire

6.3.1 Système MP avec microscope droit

Le port d'une protection oculaire (n° de commande : 156502570) est prescrit de manière obligatoire. Une protection oculaire correspondant au rayonnement laser IR est livrée avec le système. Cette protection oculaire ne protège pas du rayonnement laser visible (VIS)!

Pendant le balayage, toutes les personnes présentes dans la pièce doivent porter les lunettes de protection.

Le faisceau laser IR peut être réfléchi ou dispersé sur l'échantillon ou les objets qui ont été mis dans l'espace propre à l'échantillon. Il n'est donc pas possible d'exclure complètement un risque oculaire dû au rayonnement laser IR.

La protection oculaire fournie n'offre une protection sûre que pour les lasers à infrarouge fournis par Leica Microsystems CMS GmbH.

6.3.2 Système MP avec microscope inversé

Le port d'une protection oculaire n'est pas nécessaire. Lors d'une utilisation conforme à destination et respectant les consignes de sécurité, la limite de rayonnement laser est respectée, ce qui exclut tout risque oculaire.

6.3.3 Systèmes VIS et UV avec microscope inversé ou droit

Le port d'une protection oculaire n'est pas nécessaire. Lors d'une utilisation conforme à destination et respectant les consignes de sécurité, la limite de rayonnement laser est respectée, ce qui exclut tout risque oculaire.

6.4 Espace propre à l'échantillon

La lumière de tous les lasers VIS (plage de longueurs d'ondes 400 - 700 nm, spectre visible) et lasers UV (plage de longueurs d'ondes < 400 nm, invisible) installés est conduite par un câble à fibres optiques qui assure une protection intégrale jusqu'à ce que la lumière quitte l'objectif du microscope et atteigne la préparation. La divergence du faisceau, en fonction de l'objectif utilisé, est d'au maximum 1,16 rad.

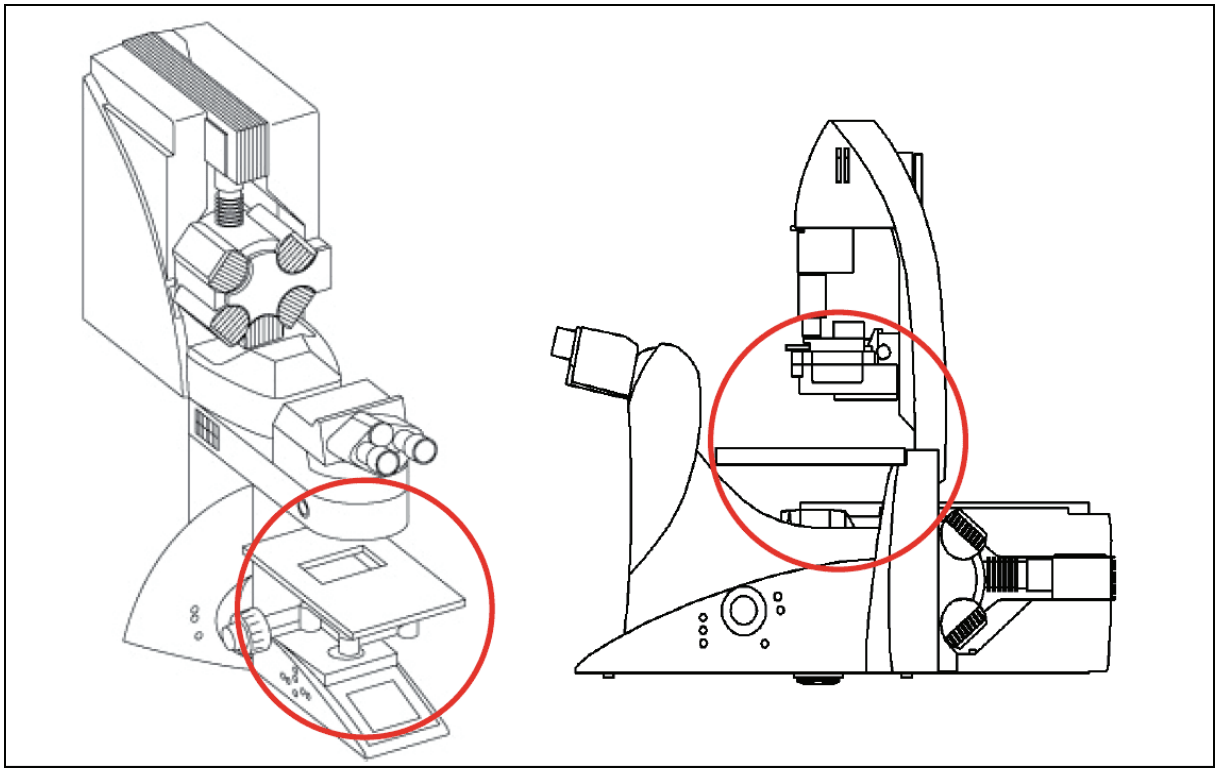


Figure 33 : Espace propre à l'échantillon sur microscopes droit et inversé

Dans l'espace propre à l'échantillon du microscope laser à balayage, le rayonnement laser est librement accessible pendant le balayage après la sortie de l'objectif.

Cet état de fait exige une attention et une prudence particulières. Tout contact oculaire avec le rayonnement laser peut causer de graves blessures oculaires. C'est pourquoi il est indispensable d'agir avec circonspection dès qu'un ou plusieurs des voyants indicateurs d'émission laser sont allumés.

En cas d'utilisation conforme à destination et de respect des consignes de sécurité lors du fonctionnement du système, il n'y a aucun risque pour l'utilisateur. Respectez une distance de sécurité d'au moins 20 cm entre vos yeux et l'ouverture de l'objectif.

6.5 Changement des échantillons

Ne changez jamais les préparations pendant un balayage.

Pour faire un changement de préparation, procédez comme suit :

Microscope droit	**Microscope inversé**
Mettez fin au balayage.	Mettez fin au balayage.
Assurez-vous qu'il n'y a plus aucun rayonnement laser dans l'espace propre à l'échantillon.	Assurez-vous qu'il n'y a plus aucun rayonnement laser dans l'espace propre à l'échantillon.
	Basculez le bras de diascopie en arrière.
Vous pouvez alors changer la préparation. Placez correctement l'échantillon dans le porte-échantillons.	Changez de préparation. Placez correctement l'échantillon dans le porte-échantillons.
	Basculez le bras de diascopie pour le ramener en position de travail.

6.6 Changement d'objectif

Ne changez pas d'objectif pendant un balayage.

Pour faire un changement d'objectif, procédez comme suit :

1. Mettez fin au balayage.
2. Eteignez le laser interne en utilisant l'interrupteur à clé.
3. Eteignez le laser externe éventuel avec son interrupteur à clé, en suivant les indications contenues dans le mode d'emploi du fabricant du laser.
4. Tournez le revolver à objectifs de sorte que l'objectif à changer pivote hors du trajet optique et pointe vers l'extérieur.
5. Changez alors d'objectif.

Toutes les positions inoccupées dans le revolver à objectifs doivent être fermées avec les capuchons fournis.

Pour les systèmes MP, les objectifs à sec (objectifs aériens) avec une ouverture numérique supérieure à 0.85 ne doivent pas être utilisés. Ceci ne s'applique pas aux objectifs à immersion (huile, eau).

Si votre système est équipé d'une mise au point piézo-électrique, respectez aussi les consignes de sécurité relatives au changement d'objectif avec mise au point piézo-électrique (voir 6.10.1).

6.7 Changer le boîtier de lampe diascopique

Si aucun boîtier de lampe diascopique n'est connecté, l'ouverture (Figure 35 ou Figure 36) doit être bien fermée avec le cache fourni avec le système (Figure 34) pour assurer une protection contre une éventuelle sortie de rayonnement laser.

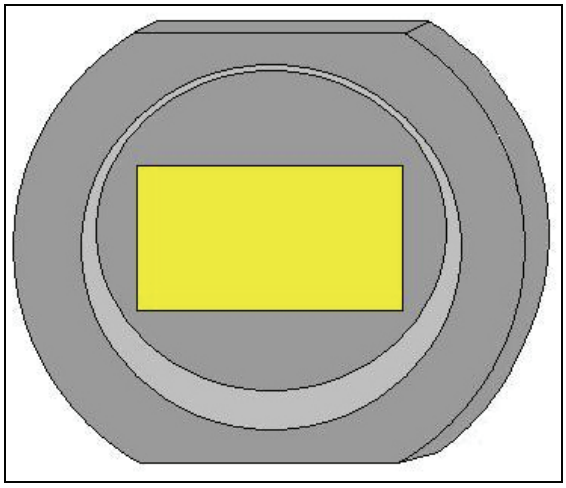


Figure 34 : Cache

Si aucun boîtier de lampe n'est connecté au microscope ou en l'absence de cache, il ne faut pas mettre les lasers en marche à cause du risque de rayonnement laser.

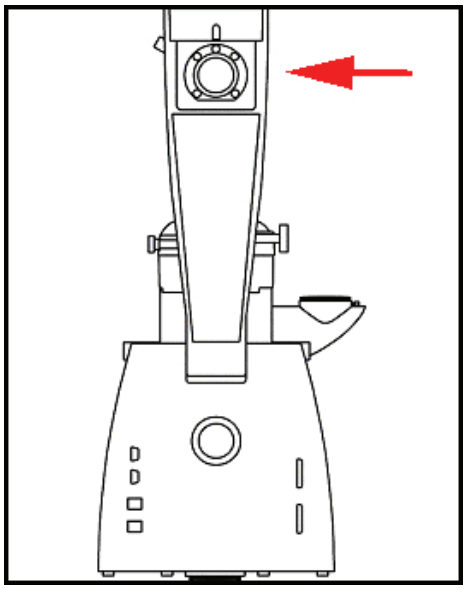


Figure 35 : Connexion du module d'éclairage diascopique sur le microscope inversé

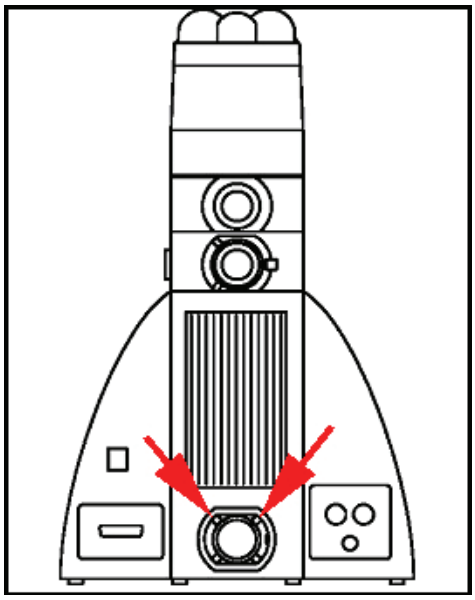


Figure 36 : Connexion du module d'éclairage diascopique ou du boîtier à miroir sur le microscope droit

Si votre microscope dispose d'un module d'éclairage diascopique que vous voulez remplacer, procédez comme suit :

1. Désactivez les lasers.
2. Débranchez le module d'éclairage de l'alimentation électrique.
3. Enlevez le module d'éclairage.
4. Réalisez sur le module d'éclairage les actions souhaitées.
5. Quand vous avez terminé, revissez le nouveau module d'éclairage sur le microscope.

6.8 Boîtier à miroir sur microscope droit

Si aucun boîtier à miroir n'est connecté au microscope droit, pour assurer une protection contre une éventuelle sortie de rayonnement laser, il faut bien fermer l'ouverture avec le cache fourni (Figure 37).

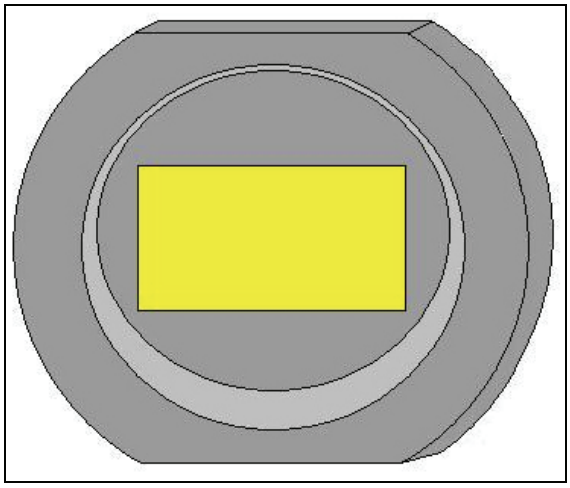


Figure 37 : Cache

Si aucun boîtier à miroir n'est connecté au microscope ou en l'absence de cache, il ne faut pas mettre les lasers en marche à cause du risque de rayonnement laser.

Si votre microscope droit dispose d'un boîtier à miroir, tenez compte les instructions suivantes :

- Si vous démontez le boîtier à miroir, vous devez obturer le port sur le microscope (Figure 36) à l'aide du cache (Figure 37).
- La prise Interlock située sur le boîtier de miroir (Figure 38, flèche 1) doit toujours être reliée à la tête de balayage.
- La sortie inutilisée du boîtier à miroir doit être fermée à l'aide du cache fourni (Figure 38, pos. 3).

Au moment de monter le cache (Figure 38, pos. 3) veillez à ce que le palpeur (Figure 38, pos. 2) soit actionné par le cache.

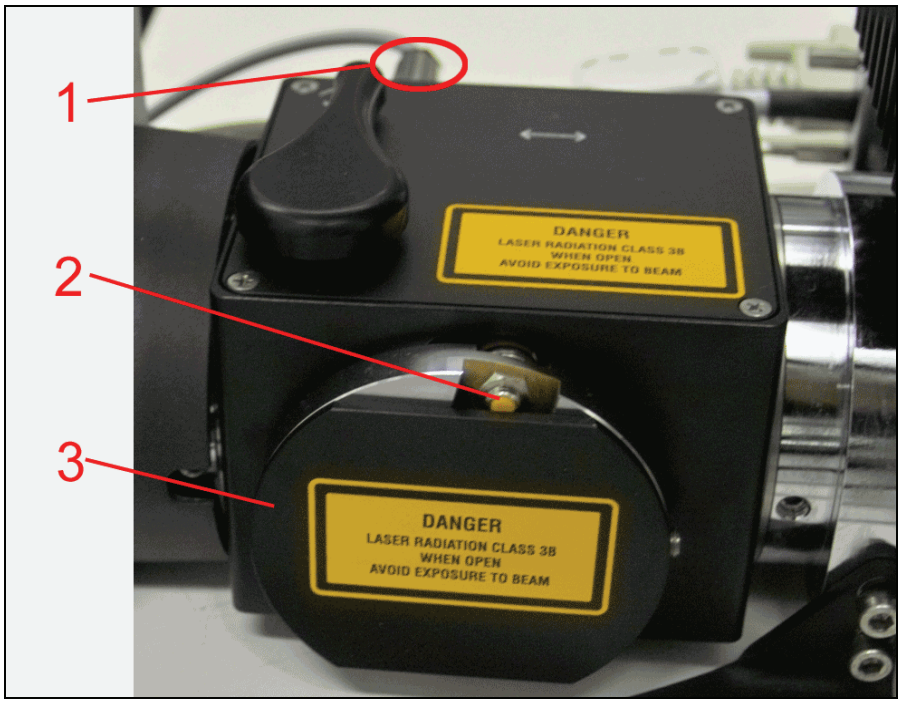


Figure 38 : Boîtier à miroir sur microscope droit

6.9 Changer le bloc de filtres, le répartiteur optique ou le condenseur

Ne changez pas de bloc de filtres ou de répartiteur optique pendant un balayage.

Dans LAS AF, réglez la tension nominale de tous les détecteurs externes sur 0 V et éteignez-les au moyen de la case à cocher. Si les détecteurs sont encore sous tension, le contact avec la lumière ambiante peut les endommager.

Pour faire un changement de bloc de filtres ou de répartiteur optique, procédez comme suit :

Microscope droit	**Microscope inversé**
Mettez fin au balayage.	Mettez fin au balayage.
Dans LAS AF, réglez la tension nominale de tous les détecteurs externes sur 0 V.	Dans LAS AF, réglez la tension nominale de tous les détecteurs externes sur 0 V.
Enlevez le cache du module de fluorescence (voir le mode d'emploi du microscope).	Retirez le module de fluorescence.
Enlevez le bloc de filtres ou le répartiteur optique.	Enlevez le bloc de filtres ou le répartiteur optique.
Installez le bloc de filtres ou le répartiteur optique souhaité.	Installez le bloc de filtres ou le répartiteur optique souhaité.
Remettez en place le cache du module de fluorescence.	Réinstallez le module de fluorescence.

Ne retirez jamais de câble à fibres optiques.

Ne séparez jamais le scanneur du microscope en cours de fonctionnement. Avant le retrait du scanneur, il faut avoir mis hors tension tout le système.

N'utilisez pas de condenseur de microscope S70. En raison de la grande distance de travail et de la faible ouverture numérique du condenseur de microscope S70, le rayonnement laser pourrait s'avérer dangereux. N'utilisez donc que les condenseurs de microscope Leica S1 et S28.

6.10 Mise au point piézo-électrique sur microscope droit

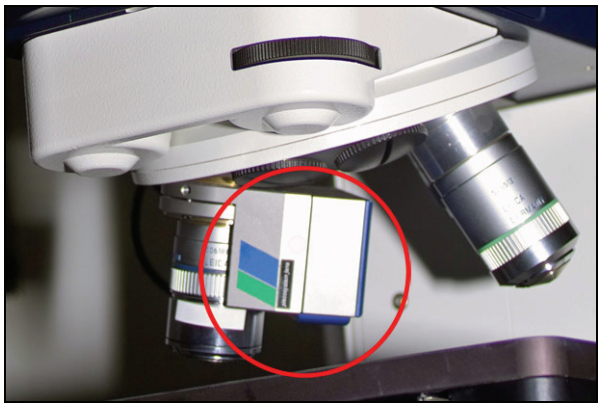


Figure 39 : Mise au point piézo-électrique sur le revolver à objectifs

Si votre système est équipé d'une mise au point piézo-électrique, veuillez respecter les consignes de sécurité ci-dessous :

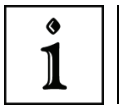
Avant d'allumer le système ou d'exécuter le logiciel LAS AF, positionnez la platine aussi bas que possible et enlevez le porte-objet/l'échantillon de la platine.
Sinon, l'initialisation de la mise au point piézo-électrique risque d'endommager ou de détruire l'échantillon et le porte-objet pendant le démarrage du système/logiciel !

La course de l'objectif est limitée à 150 µm vers le haut ou le bas. La course totale est de 300 µm.

Figure 40 : Contrôleur de la mise au point piézo-électrique

Affichage sur le contrôleur de la mise au point piézo-électrique :

Position haute :	350 µm
Position moyenne :	200 µm
Position basse :	50 µm
Zone de balayage xz :	250 µm



Ne modifiez aucun réglage sur le contrôleur, celui-ci ayant été réglé de manière optimale par Leica.

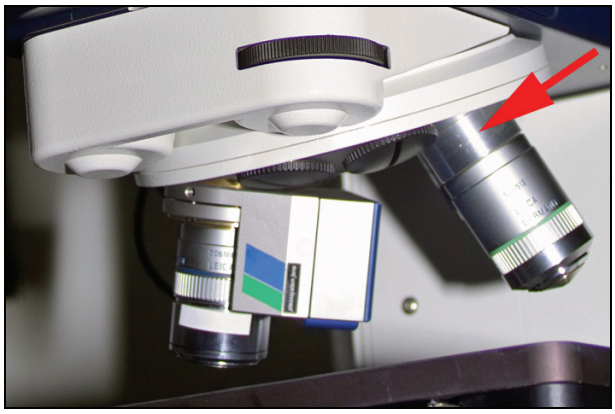


Figure 41 : Douille-entretoise sur l'objectif

Notez que la position de focalisation d'un objectif avec une mise au point piézo-électrique est 13 mm plus basse qu'avec les objectifs ordinaires. Pour assurer que le plan de mise au point soit le même, une douille-entretoise est installée sur tous les autres objectifs (Figure 41).

6.10.1 Changement d'objectif avec une mise au point piézo-électrique

Ne pas effectuer le changement d'objectif automatiquement ! Le mouvement automatique risquerait d'endommager le câble de la mise au point piézo-électrique !

Avant de changer l'objectif associé à la mise au point piézo-électrique, vous devez en plus de la procédure normale (voir le chapitre 6.6) abaisser le plus possible la platine et enlever de la platine le porte-objet ou l'échantillon. Sinon, l'initialisation de la mise au point piézo-électrique risque d'endommager ou de détruire l'échantillon et le porte-objet pendant le démarrage du système/logiciel !

Après un remplacement de l'objectif sur la mise au point piézo-électrique, déclarez le nouvel objectif dans le logiciel LAS. Suivez attentivement les instructions contenues dans le mode d'emploi du microscope.

7. Mise en service du système

7.1 Mise en marche du système

Avec la platine motorisée (156504145) pour le DMI 6000 (inverse) :
Puisque la platine motorisée est initialisée et pour éviter d'endommager le condenseur, le bras d'éclairage du microscope inverse doit être pivoté vers l'arrière avant le démarrage du système ou de LAS AF.
Avec la platine motorisée (156504155) pour le DM 6000 (droit) :
La platine doit être positionnée en position basse avant le démarrage du système ou avant la mise en marche du LAS AF, car elle pourrait toucher le revolver à objectif pendant l'initialisation et endommager les objectifs.

1. Sur le pupitre de commande, allumez la station de travail (commutateur PC).

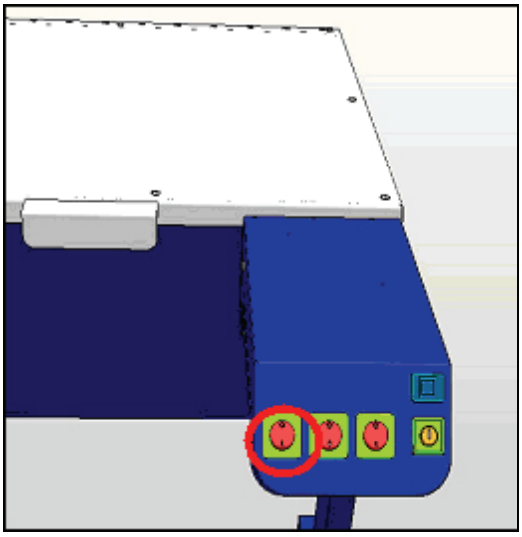


Figure 42 : Mise en marche de l'ordinateur de contrôle

Le système d'exploitation démarre automatiquement, dès que vous allumez la station de travail. Attendez la fin de la procédure de démarrage.

2. Connectez-vous au système d'exploitation. Appuyez simultanément sur les touches **Ctrl**, **Alt** et **Suppr** pour demander l'ouverture de la boîte de dialogue Login Information.

Si vous avez un compte d'utilisateur, utilisez celui-ci. Ceci offre l'avantage de pouvoir enregistrer et réutiliser les paramètres personnalisés. Si l'administrateur système n'a pas encore créé votre compte, connectez-vous en utilisant le nom d'utilisateur "TCS_User". Un mot de passe n'est pas nécessaire.

Une fois que vous vous êtes enregistré avec votre code utilisateur, vous pouvez modifier votre mot de passe. Pour cela, appuyez simultanément sur les touches **Ctrl**, **Alt** et **Suppr**.
Cliquez ensuite sur **Change password**. Une boîte de dialogue s'ouvre : **Change password**.

3. Vérifiez que le microscope est sous tension. Quand le voyant de disponibilité (Figure 43, position 1) est allumé sur le boîtier électronique, cela signifie que le microscope est en marche. Si le voyant de disponibilité est éteint, il faut actionner l'interrupteur à bascule (Figure 43, position 2) du boîtier électronique.

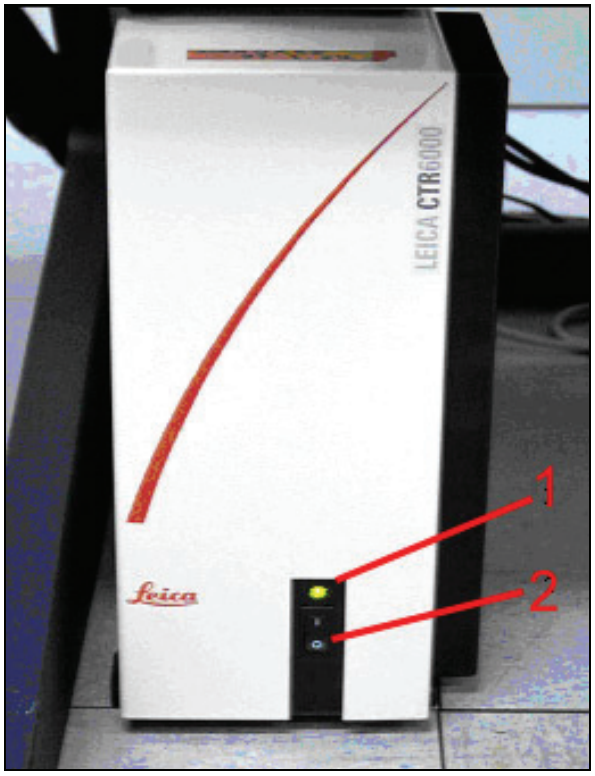


Figure 43 : Mise sous tension du microscope

4. Sur le pupitre de commande, mettez en marche le scanneur.

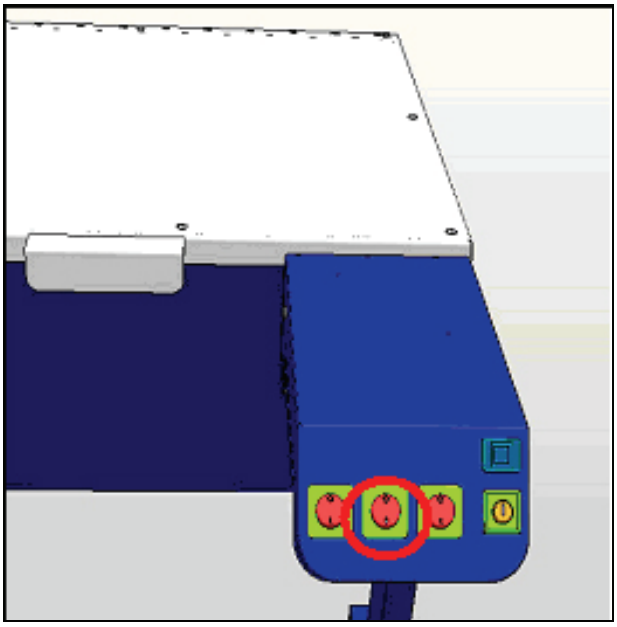


Figure 44 : Mise sous tension du scanneur

5. Sur le pupitre de commande, mettez les lasers en marche.

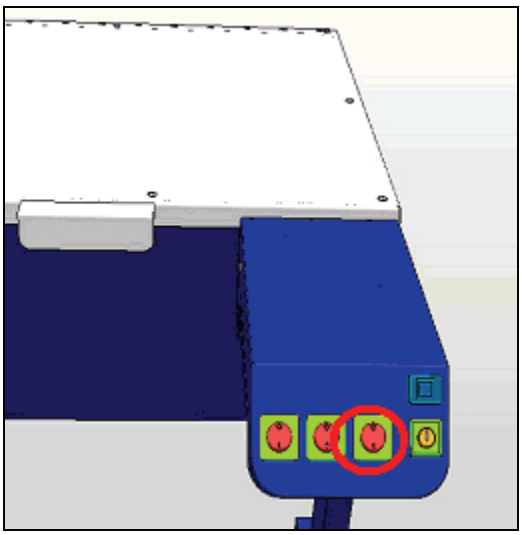


Figure 45 : Mise sous tension du laser

Les blocs d'alimentation et les ventilateurs du système démarrent.

Le bloc d'alimentation du laser à lumière blanche démarre quand l'interrupteur principal situé sur le panneau arrière du laser à lumière blanche est en position "**On**“ (Allumé).

6. Pour la mise en circuit des lasers dans l'unité d'alimentation électrique, actionnez l'interrupteur à clé du pupitre de commande (voir Figure 46).

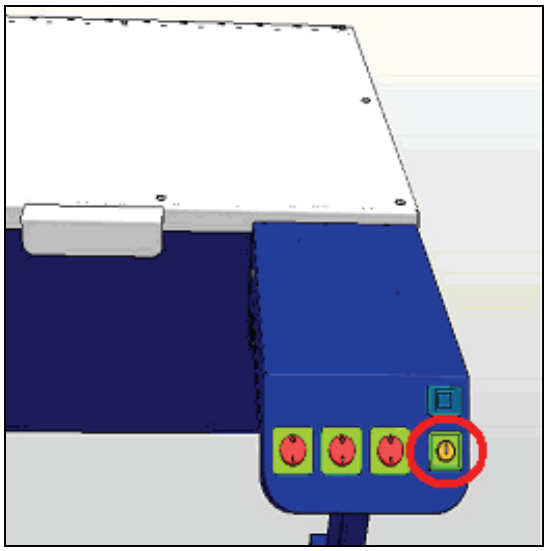


Figure 46 : Actionnement de l'interrupteur à clé

7. Pour la mise en marche du laser à lumière blanche, actionnez l'interrupteur à clé situé en façade du laser à lumière blanche (voir Figure 47) [5].

Figure 47 : Interrupteur à clé du laser à lumière blanche

À partir de ce moment, il peut y avoir un rayonnement laser dans l'espace propre à l'échantillon du microscope laser à balayage. Observez les consignes de sécurité du chapitre Consignes de sécurité concernant l'exploitation du système6.

[5] Concerne seulement le système TCS SP5 X.

Si la température ambiante est supérieure à 40 °C, le laser à lumière blanche se met hors circuit. L'écran du laser à lumière blanche affiche un message d'erreur. La température de la pièce doit redevenir normale pour que la remise en marche du laser à lumière blanche soit possible.

Si le laser à lumière blanche est exposé à des secousses, l'écran du laser peut afficher un message d'erreur. Dans ce cas, éteignez le laser à lumière blanche et remettez-le en marche 10 secondes après.

8. Pour la mise en marche du laser externe UV, actionnez l'interrupteur à clé situé en façade du laser à lumière blanche (voir) [6].

Figure 48 : Interrupteur à clé du laser externe UV

À partir de ce moment, il peut y avoir un rayonnement laser dans l'espace propre à l'échantillon du microscope laser à balayage. Observez les consignes de sécurité du chapitre 6Consignes de sécurité concernant l'exploitation du système.

Pour éteindre le système, respectez les indications fournies au chapitre 8 Mise hors circuit du système.

[6] Concerne uniquement les systèmes avec un laser externe UV.

7.2 Exécution de LAS AF

Avec la platine motorisée (156504145) pour le DMI 6000 (inverse) :
Puisque la platine motorisée est initialisée et pour éviter d'endommager le condenseur, le bras d'éclairage du microscope inverse doit être pivoté vers l'arrière avant le démarrage du système ou de LAS AF.
Avec la platine motorisée (156504155) pour le DM 6000 (droit) :
La platine doit être positionnée en position basse avant le démarrage du système ou avant la mise en marche du LAS AF, car elle pourrait toucher le revolver à objectif pendant l'initialisation et endommager les objectifs.

1. Démarrez le logiciel en cliquant sur l'icône LAS AF du bureau :

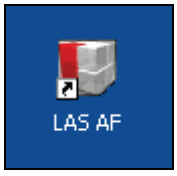


Figure 49 : Symbole LAS AF sur le bureau

2. Choisissez si le système doit être utilisé en mode résonant ou non résonant.

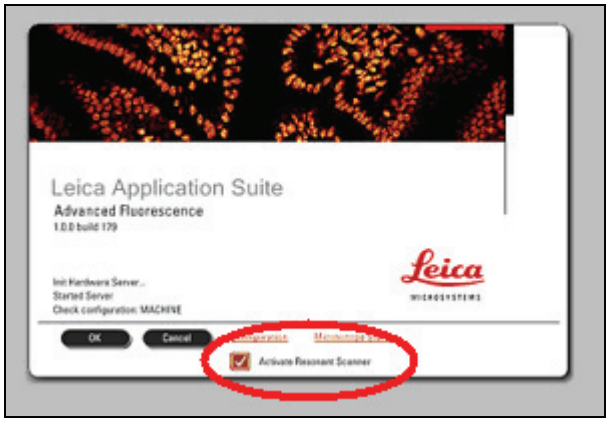


Figure 50 : Fonctionnement résonant ou non

3. A présent, démarrez le programme LAS AF en cliquant sur le bouton "OK".

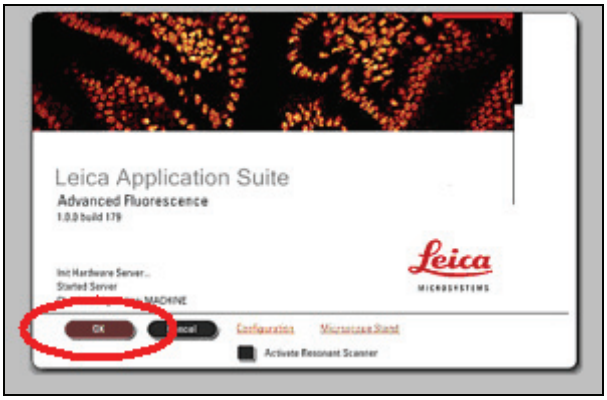


Figure 51 : Fenêtre de démarrage LAS AF

A présent, vous vous trouvez dans la vue de base de LAS AF.

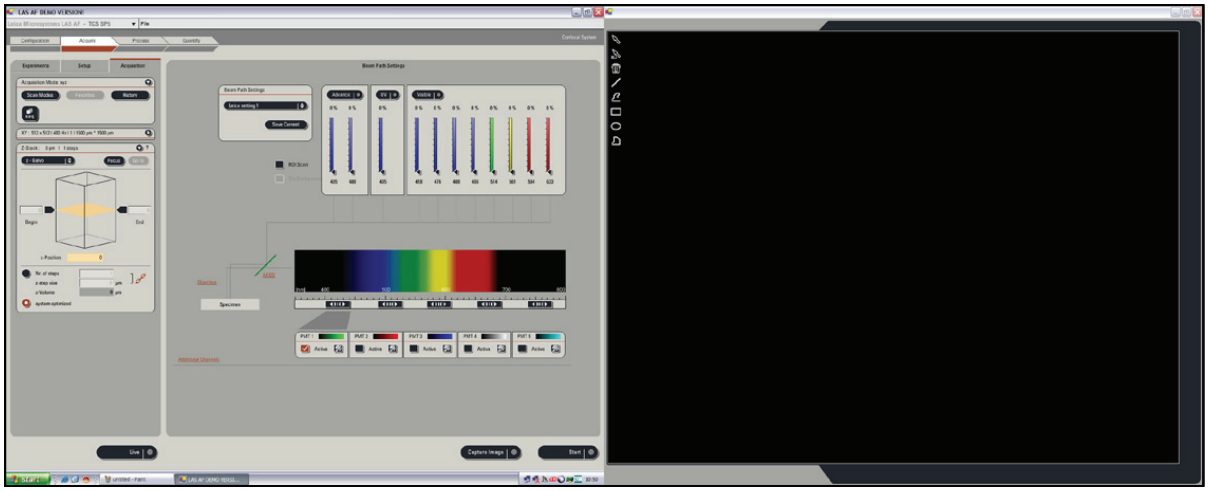


Figure 52 : Vue de base LAS AF[7]

[7] L'affichage peut varier selon la configuration système.

7.3 Création d'un utilisateur

Le nom d'utilisateur standard du système est ”TCS_User”. Un mot de passe par défaut n'est pas défini. Il est recommandé de créer une ID utilisateur spécifique pour chaque utilisateur du système (en utilisant l'administrateur de système). Des répertoires personnels sont créés, qui ne peuvent être ouverts que par l'utilisateur concerné. Comme le logiciel LAS AF est basé sur la gestion des utilisateurs du système d'exploitation, des fichiers particuliers sont aussi créés pour la gestion des profils spécifiques aux utilisateurs du logiciel LAS AF.

1. Enregistrez-vous en tant qu'administrateur. Utilisez le nom d'utilisateur (ID) : "Administrator" et le mot de passe : "Admin"
2. Ouvrez le gestionnaire des utilisateurs (User-Manager). Sélectionnez : **Start / Programs / Administrative Tools / User Manager.**
3. Définissez un nouvel utilisateur. A cette fin, entrez dans la boîte de dialogue ouverte au minimum les indications suivantes :
   - Nom d'utilisateur
   - Password (doit être entré une deuxième fois pour confirmation dans la ligne suivante)
4. Sélectionnez les deux cases à cocher suivantes :
   - **User must change password at next logon** (afin que le nouvel utilisateur puisse définir son propre mot de passe pour l'enregistrement).
   - **Password never expires** (le mot de passe reste valable jusqu'à ce qu'il soit modifié dans **User Manager** ou effacé par l'utilisateur).
5. Sélectionnez l'option **Profiles** dans la partie inférieure de la boîte de dialogue. A présent, indiquez dans le champ **Local path** le chemin d'accès suivant pour l'enregistrement du fichier spécifique à l'utilisateur : **d:\users\username** ("username" est un paramètre substituable. A cet endroit, il faut en effet entrer un nom d'utilisateur défini.)

Les disques durs montés en atelier sont livrés avec deux partitions (C:\ et D:\). Le répertoire utilisateur doit se trouver sur la partition D:\ .

8. Mise hors circuit du système

Respectez impérativement la séquence de mise hors circuit ! Le non-respect de la séquence de mise hors circuit mentionnée ci-après peut endommager les lasers !

1. Enregistrement des données-images : Sélectionnez dans la ligne de menu : **File** → **Save as** pour enregistrer l'enregistrement de données.
2. Fermez l'application LAS AF : Dans la barre de menu, sélectionnez **File** → **Exit**. Fermez le logiciel LAS AF.
3. En actionnant l'interrupteur à clé (Figure 56, position 2) du pupitre de commande, mettez les lasers hors tension dans l'unité d'alimentation électrique. Le voyant indicateur d'émission laser (Figure 56, position 1) s'éteint.
4. Arrêtez le laser à lumière blanche avec l'interrupteur à clé (voir Figure 53) situé en façade du laser. Le voyant indicateur d'émission laser s'éteint. [8]

Figure 53 : Interrupteur à clé du laser à lumière blanche

5. En actionnant l'interrupteur à clé (voir Figure 54), mettez le laser externe UV hors tension. Le voyant indicateur d'émission laser s'éteint. [9]

Figure 54 : Interrupteur à clé du laser externe UV

[8] Concerne seulement le système TCS SP5 X.
[9] Concerne uniquement les systèmes avec un laser externe UV.

6. Arrêtez à présent l'ordinateur. Dans la barre d'outils, sélectionnez **Start** → **Shutdown** pour arrêter l'ordinateur de contrôle du TCS.

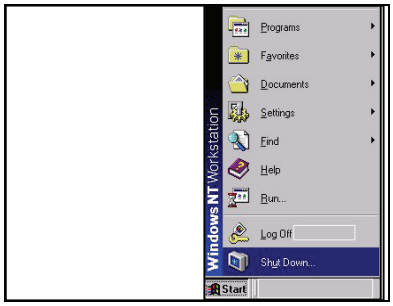


Figure 55 : Arrêt de l'ordinateur

7. Sur le pupitre de commande, mettez en position d'arrêt les interrupteurs de l'ordinateur de contrôle TCS (Figure 56, position 5), du scanneur (Figure 56, position 4) et des lasers (Figure 56, position 3).

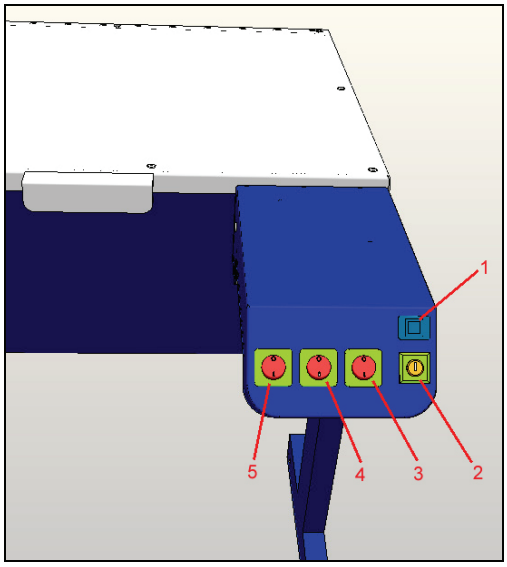


Figure 56 : Pupitre de commande (1 = voyant indicateur d'émission laser, 2 = interrupteur à clé, 3 = interrupteur des lasers, 4 = interrupteur du scanneur, 5 = interrupteur de l'ordinateur)

8. Eteignez le microscope et les éventuelles lampes fluorescentes allumées.

Si votre système dispose de lasers externes (laser IR, laser UV, etc.), vous devez les mettre hors tension en suivant les instructions contenues dans les manuels d'utilisation fournis par le fabricant du laser.

9. Introduction au LAS AF

9.1 Généralités

Le logiciel LAS AF sert à la commande de l'ensemble des fonctions système, et d'interface aux différents composants matériels.
Le "concept d'expérience" du logiciel permet de gérer en commun les données combinées logiquement entre elles. L'expérience est visualisée sous forme d'arbre dans le logiciel et dispose de fonctions d'exportation permettant d'ouvrir des images individuelles (JPEG, TIFF) ou des animations (AVI) dans une application externe.

9.2 Aide en ligne

9.2.1 Organisation de l'Aide en ligne

L'Aide en ligne est scindée en 4 chapitres :

Manuels	Contenu
Généralités	Contient les notes légales et les informations générales sur LAS AF.
Aide en ligne LAS AF	Contient des informations générales sur l'Aide en ligne LAS AF.
Descriptions des boîtes de dialogue	Contient une description détaillée des boîtes de dialogues de l'interface utilisateur LAS AF.
Informations complémentaires	Contient des informations complémentaires sur le LAS AF et des thèmes relatifs aux applications, par exemple le traitement d'image numérique et la séparation des colorants (Dye Separation).

9.2.2 Appel de l'Aide en ligne

L'appel de l'aide en ligne peut s'effectuer de trois manières différentes :

Dans le contexte respectif (**contextuel**)

Par le menu **Help**

Via la combinaison de touches **CTRL + F1**

Dans le contexte respectif (contextuel)
Cliquez sur le point d'interrogation se trouvant dans l'angle supérieur droit de chaque boîte de dialogue.
L'aide en ligne s'ouvre sur la description de la fonction correspondante.

Par le menu Help
Cliquez dans la barre de menus sur la commande Help. Le menu s'ouvre vers le bas et présente différentes options de recherche, dont :

Contents	Ce champ de dialogue comprend un sommaire arborescent, qui peut être agrandi ou réduit. Double-cliquez sur une entrée du sommaire afin d'afficher les informations correspondantes.
Index	Entrez le terme que vous voulez chercher. L'aide en ligne vous indique le mot clé qui se rapproche le plus du critère mentionné. Sélectionnez un mot clé. Pour afficher la page d'aide correspondant au mot-clé recherché, double-cliquez sur le mot-clé ou cliquez sur le bouton Display.
Search	Entrez le terme ou l'expression à rechercher et cliquez sur le bouton LIST TOPICS (afficher les sujets). A présent, une liste de rubriques à structure hiérarchique s'affiche.
About	Ouvre la boîte de dialogue **User Configuration** où vous pouvez, entre autres, sélectionner la langue dans laquelle l'aide en ligne sera présentée.

9.2.3 Recherche globale avec critères de recherche à liens logiques

En cliquant dans l'onglet **Search** sur le triangle à droite de la boîte de saisie, vous faites afficher les opérateurs logiques.

1. Sélectionnez l'opérateur souhaité.
2. A la suite de l'opérateur, entrez la deuxième clé de recherche liée au premier par l'opérateur :

Exemples	Résultats
diaphragme and découpes	Cette expression recherche les rubriques d'aide contenant à la fois le mot "diaphragme" et le mot "découpes".
diaphragme or découpes	Cette expression recherche les rubriques d'aide contenant soit le mot "diaphragme", soit le mot "découpes", ou les deux.
diaphragme near découpes	Cette expression recherche les rubriques d'aide, dans lesquelles le mot "diaphragme" et le mot "découpes" sont à une certaine distance l'un de l'autre. En outre, la fonction recherche aussi les mots ayant une orthographe similaire.
diaphragme not découpes	Cette expression recherche les rubriques d'aide contenant le mot "diaphragme", mais pas le mot "découpes".

9.3 Organisation de l'interface utilisateur

9.3.1 Organisation générale de l'interface utilisateur

L'interface utilisateur de l'application LAS AF est scindée en cinq zones :

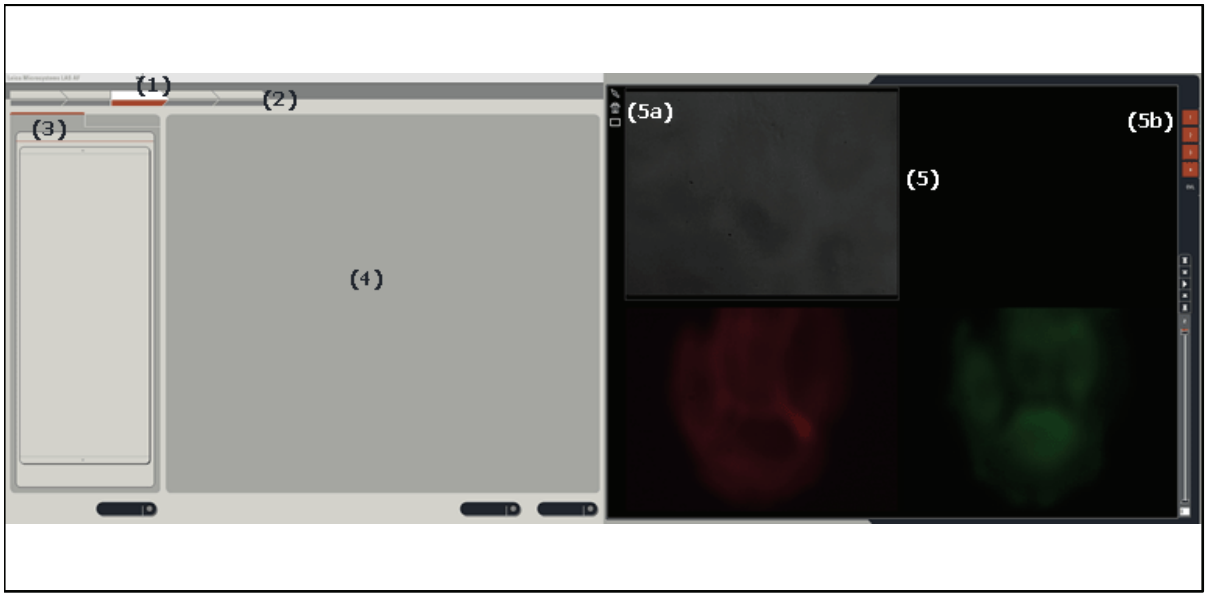


Figure 57 : Interface utilisateur du logiciel LAS AF

1 **Barre de menus :** la barre de menus contient les menus qui servent à exécuter les fonctions.

2 **Symboles flèches :** étapes de travail avec les différentes fonctions. Ces étapes de travail reflètent le déroulement typique d'une acquisition d'image et du traitement d'image consécutif. Les fonctions ont été regroupées selon ces étapes de travail.

- Configuration
- Acquire
- Process
- Quantify
- Application

3 **Onglets :** A chaque étape de travail (symbole flèche) appartiennent différents onglets, dans lesquels il est possible d'effectuer les réglages pour l'expérience.

Acquire	Experiments : Arbre des répertoires des fichiers ouverts
	Setup : Paramétrages matériels pour l'expérience actuelle
	Acquisition : Paramétrages pour l'acquisition d'image
Process	Experiments : Arbre des répertoires des fichiers ouverts
	Tools : Arbre des répertoires avec toutes les fonctions disponibles dans l'étape de travail respective
Quantify	Experiments : Arbre des répertoires des fichiers ouverts
	Tools : Onglets avec les fonctions disponibles dans cette étape de travail
	Graphs : Représentation graphique de valeurs mesurées figurant dans les régions d'intérêt (ROI)
	Statistics : Affichage des valeurs statistiques, qui ont été déterminées dans les régions d'intérêt (ROI) présentes

4 **Zone de travail :** Dans cette zone est disponible la boîte de dialogue Beam Path Settings, dans laquelle se trouvent les éléments de contrôle pour le réglage des paramètres d'acquisition.

5 **Fenêtre Viewer :** Sert à l'affichage des images acquises. Dans le paramétrage standard, la fenêtre Viewer est composée de la fenêtre d'image au centre et des boutons pour le traitement d'image (5a) et l'affichage du canal (5b).

9.4 Raccourcis clavier

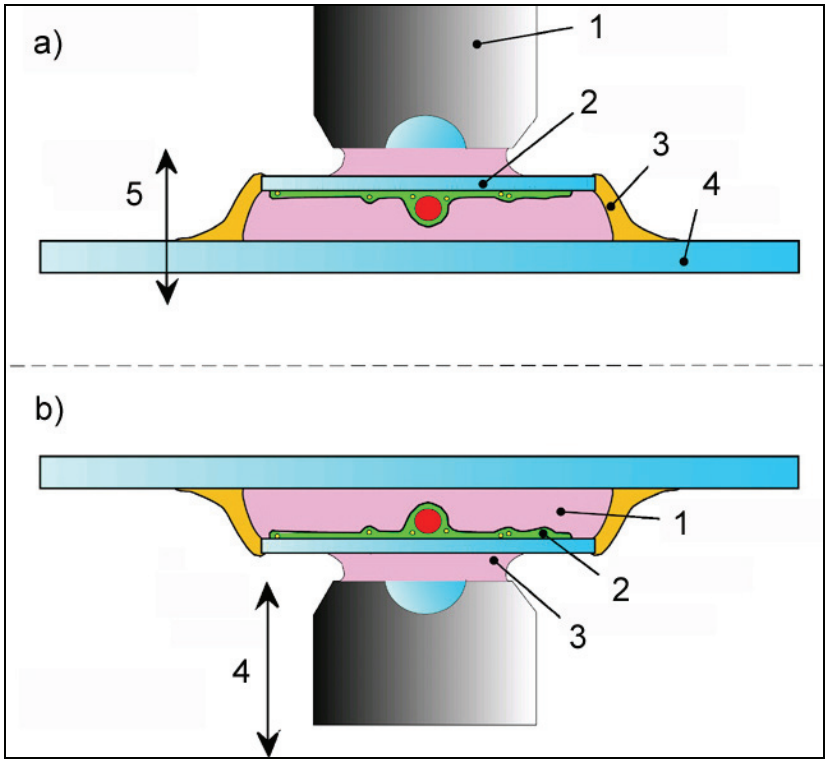
Pour accélérer l'exécution des fonctions logicielles récurrentes, vous pouvez également utiliser les combinaisons de touches suivantes :

CTRL + N	Ouvre une nouvelle expérience
CTRL + O	Ouvre la boîte de dialogue Open permettant d'ouvrir un fichier existant.

10. Introduction au travail confocal

10.1 Préparation

Ces chapitres décrivent les gestes de base qui permettent d'effectuer la plupart des tâches rendues possibles par cet appareil.



a) Microscope droit

1 Objectif
2 Couvre-objet
3 Étanchement
4 Porte-objet
5 Stage-Focus

b) Microscope inversé

1 Enrobage
2 Échantillon
3 Immersion
4 Lens-Focus

Figure 58 : Disposition du couvre-objet et de la préparation dans un microscope droit (a) et un microscope inversé (b). En cas d'utilisation d'objectifs équipés d'une correction du couvre-objet, vous devez veiller à ce que le couvre-objet (donc le dessus des préparations enrobées) pointe vers le bas.

Des informations complémentaires sont fournies afin de vous aider à comprendre la raison d'être et le but des divers réglages à réaliser. Il ne s'agit donc pas d'une simple description des fonctions et boutons de l'appareil et de l'interface graphique utilisateur, mais d'une information complète sur les tâches essentielles. Cette information est régulièrement mise à jour au fur et à mesure des rééditions ou améliorations.

Bien sûr, il faut commencer par placer une préparation dans le microscope. Lors de la pose de la préparation dans un microscope inversé, veillez à ce que les objets fixés sur les porte-objets avec le couvre-objet soient dirigés vers le bas (Figure 58). C'est une cause fréquente d'erreur, qui rend la préparation introuvable ou empêche un réglage correct.

10.1.1 L'objectif

Sélectionnez l'objectif qui servira à examiner la préparation.

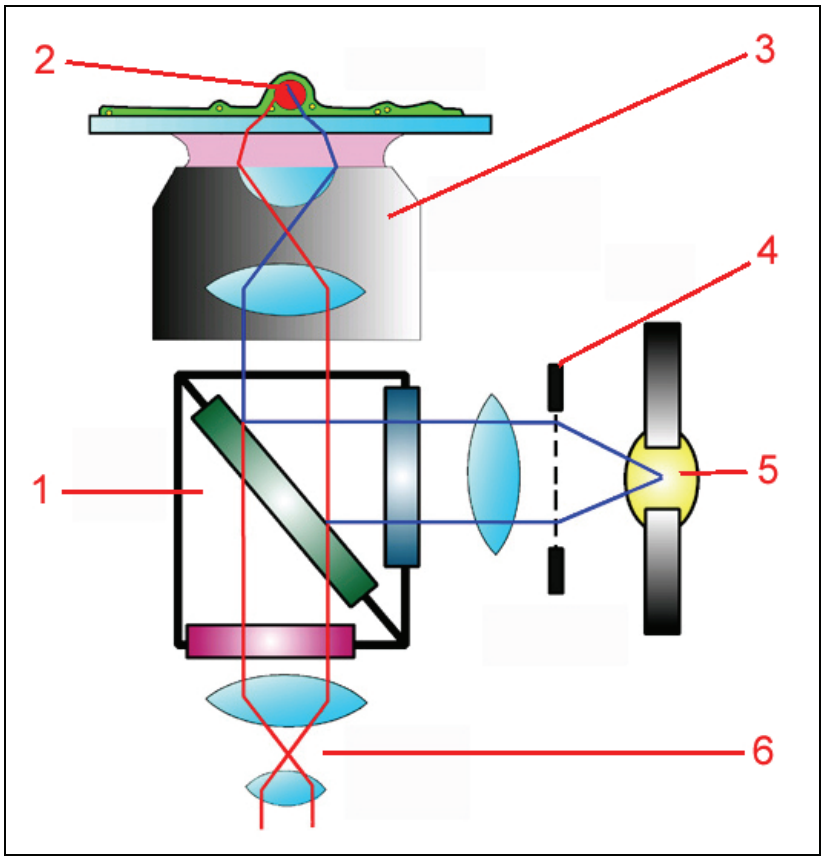
Milieu		**Indice de réfraction**
Eau	Imm	1,333
PBS	Enr	1,335
Glycérol 80 % (H_2O)	Imm	1,451
Vectashield	Enr	1,452
Glycérol	Imm	1,462
Moviol	Enr	1,463
Glycérol gélatiné selon Kaiser	Enr	1,469
Verre	Mat	1,517
Huile	Imm	1,518
Baume du Canada	Enr	1,523

Tableau 3 Tableau des divers milieux d'immersion

En cas d'utilisation d'objectifs à immersion, vérifiez que le milieu d'immersion présent entre la préparation et la lentille frontale de l'objectif est en quantité suffisante. L'eau, la glycérine à 80 % et l'huile d'immersion sont utilisées comme milieu d'immersion (tab. 3). Appliquez-en généreusement. Toutefois, dans le cas des microscopes inversés, veillez à ce que le liquide ne s'infiltre pas dans le statif.

10.1.2 Microscopie classique

Pour voir la préparation de la façon classique, c'est-à-dire directement dans les oculaires, il faut que le mode de fonctionnement soit réglé sur "VISUAL". "SCAN" est le mode d'enregistrement par balayage laser. Recherchez ensuite une position appropriée et faites une mise au point de la préparation.



1 Bloc de filtres

2 Échantillon

3 Lentille d'objectif

4 Obturateur

5 Lampe

6 Oculaire

Figure 59 : Schéma de fluorescence en lumière réfléchie : la lumière provenant d'une lampe au mercure est collimatée avec un filtre d'excitation et la sélection spectrale est dirigée vers l'échantillon au moyen d'un miroir chromatique. Un obturateur permet d'obscurcir la préparation. L'émission (d'une longueur d'onde supérieure à celle de l'excitation) est rendue visible dans l'oculaire grâce au miroir chromatique et à un filtre d'émission. Le filtre d'excitation, le miroir chromatique et le filtre d'émission sont réunis dans un bloc de filtres.

Les coupes optiques sont produites en lumière réfléchie. Votre échantillon doit donc être réfléchissant ou fluorescent. Dans la plupart des cas, les préparations sont fluorescentes. Souvent, il s'agit d'examiner un échantillon aux colorations multiples. Mais les préparations réfléchissantes donnent elles aussi des résultats intéressants.

Si vous voulez observer la préparation dans les oculaires en vision simple, il est nécessaire de faire pivoter dans le trajet optique les blocs de filtres (Figure 59) appropriés pour les fluorescences. Pour la sélection des blocs de filtres de fluorescence, consultez la brochure Leica consacrée à la fluorescence ou demandez conseil à votre chargé de clientèle Leica. Le tableau 4 de ce document présente une sélection de blocs de filtres.

Du fait que la fluorescence de la préparation peut décolorer rapidement, veillez à ce que l'obturateur placé devant la lampe à vapeur de mercure soit toujours fermé quand vous ne regardez pas dans le microscope.

Pour commuter en mode Balayage (Scan), appuyez sur les touches correspondantes du microscope ou activez la fonction de commutation du logiciel. La commutation peut varier en fonction de la motorisation du microscope. Si vous avez des questions, consultez l'Aide.

Bloc de filtres	Filtre d'excitation	Miroir dichroïque	Filtre d'émission
a.	BP 340-380	400	LP 425
B/G/R	BP 420/30	415	BP 465/20
B/R	420/20;530/45	435;565	465/30;615/70
BFP/GFP	BP 385/15	420	BP 460/20
CFP	BP 436/20	455	BP 480/40
D	BP 335-425	455	LP 470
E4	BP 436/7	455	LP 470
FI/RH	BP 490/15	500	BP 525/20
G/R	BP 490/20	505	BP 525/20
GFP	BP 470/40	500	BP 525/50
H3	BP 420-490	510	LP 515
I3	BP 450-490	510	LP 515
K3	BP 470-490	510	LP 515
L5	BP 480/40	505	BP 527/30
M2	BP 546/14	580	LP 590
N2,1	BP 515-560	580	LP 590
N3	BP 546/12	565	BP 600/40
Y3	BP 545/30	565	BP 610/75
Y5	BP 620/60	660	BP 700/75
YFP	BP 500/20	515	BP 535/30

Tableau 4 Sélection de quelques blocs de filtres pour les microscopes de recherche Leica et spécifications de filtres associées.

10.1.3 Pourquoi faire un balayage ?

Afin d'obtenir une véritable image confocale (ce qui est la seule façon de créer des coupes optiques vraiment minces), il faut éclairer la préparation sur une zone qui soit la plus petite possible.
On y parvient quand la tache éclairée est limitée par diffraction et qu'il n'est donc plus possible de la diminuer physiquement. Le diamètre d'une tache ainsi limitée par diffraction est d_B=1,22*ë/NA, où ë est la longueur de l'onde d'excitation et NA l'ouverture numérique de l'objectif utilisé (Figure 61).

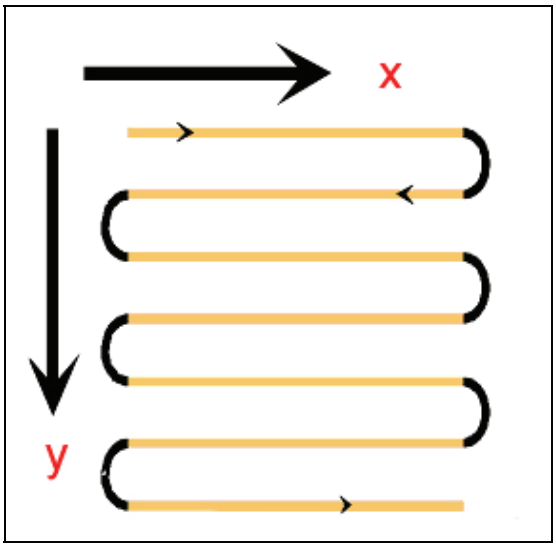


Figure 60 : Esquisse graphique du balayage. **Au moyen de deux miroirs, le spot est déplacé au-dessus de l'échantillon, ligne par ligne sur le plan (x, y) de façon à pouvoir reconstruire la totalité de l'image en parallèle.**

Pour assembler une image bidimensionnelle, il faut maintenant déplacer ce spot sur toute la surface et enregistrer point par point le signal associé.

Cela s'effectue lors d'un balayage très semblable à celui des microscopes électroniques à balayage ou des tubes à faisceau électronique, comme ceux qui sont encore utilisés pour les moniteurs d'ordinateurs ou les téléviseurs (Figure 60). Dans un microscope confocal avec balayeur point par point, le déplacement est réalisé avec deux miroirs qui sont montés sur des galvanomètres. Ces scanneurs sont montés comme des moteurs électriques de sorte que le rotor ne se déplace pas librement, mais qu'il soit solidement fixé au carter par la base. Si l'on applique une tension, l'axe tourne et la rotation s'arrête quand les forces de torsion et la force électromagnétique sont en équilibre. Ainsi, l'application d'une tension alternative permet de faire bouger le miroir vers la droite selon un angle déterminé.

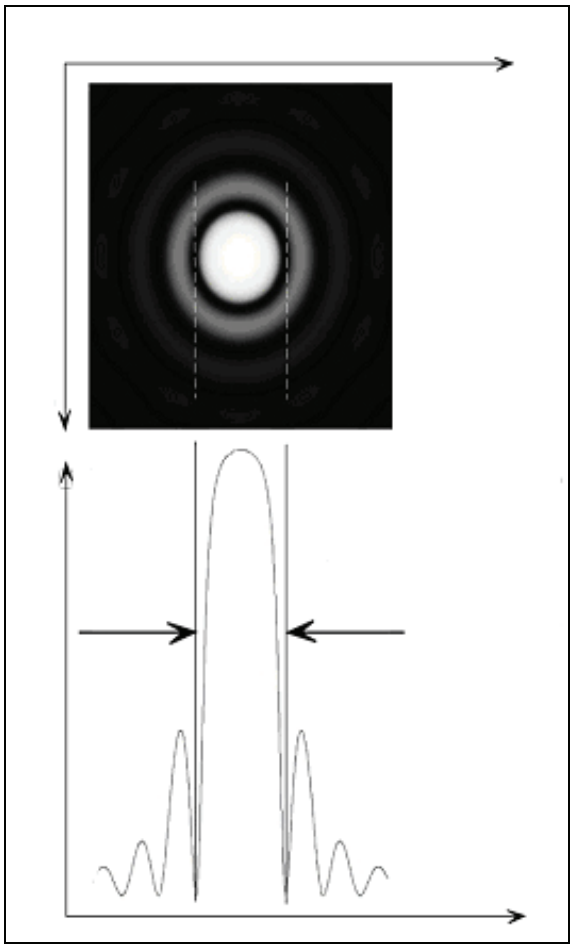


Figure 61 : Spot limité par la diffraction et dont la diminution n'est plus possible (tache d'Airy). En bas, profil d'intensité.

Pour imager une ligne, il faut déplacer le miroir x au-dessus du champ de vision et décaler un peu le miroir y. Puis, le miroir x passe à la ligne suivante. Les signaux provenant de l'échantillon sont mémorisés de façon synchrone, ce qui permet de les représenter sur le moniteur.

10.1.4 Comment s'effectue une coupe optique ?

La désignation "confocal" est purement technique ; elle ne décrit pas les effets de cette disposition. Nous allons les rappeler ici.
Comme cela a déjà été décrit à la section 10.1.3, la préparation est toujours éclairée sur la plus petite tache lumineuse possible, d'où la désignation "focal". La disposition confocale prévoit aussi une observation punctiforme. L'on obtient cette "répartition de la sensibilité" punctiforme du détecteur en focalisant la lumière de l'échantillon sur une très petite ouverture, appelée "trou d'aiguille". Ce trou d'aiguille permet d'éliminer l'information qui ne provient pas du plan de mise au point (Figure 62).

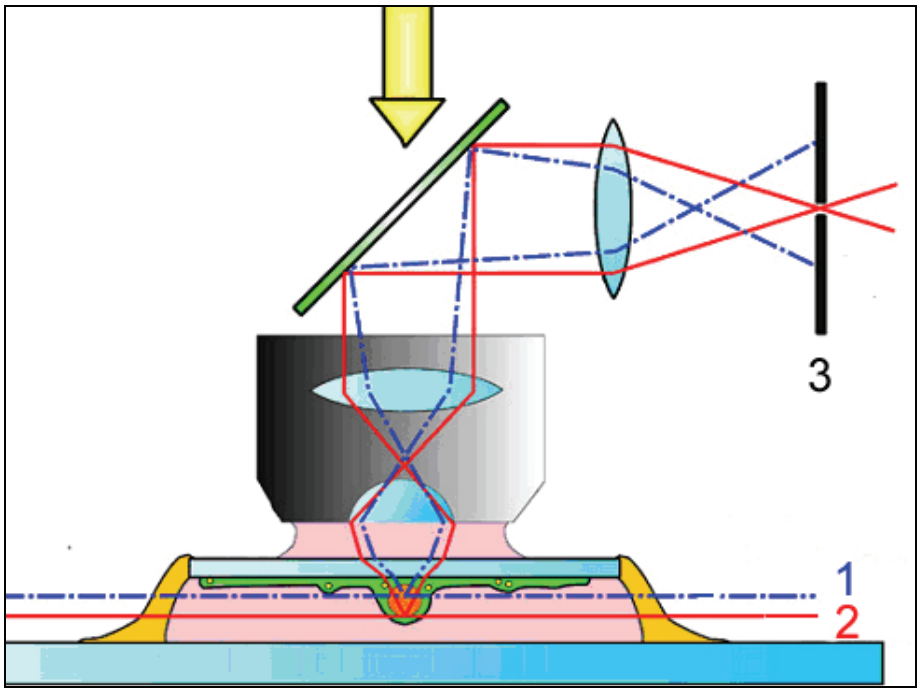


Figure 62 : Création d'une coupe optique en lumière réfléchie. La lumière qui ne provient pas du plan de mise au point est séparée au moyen d'un filtre spatial (ici, un "trou d'aiguille"). Seule l'information focalisée peut atteindre un détecteur.

Le diaphragme agit donc comme un filtre spatial, bien sûr seulement si l'éclairage est correct, c-à-d. punctiforme.

En principe, la coupe optique devient de plus en plus mince au fur et à mesure que le trou d'aiguille devient de plus en plus petit. A proximité de la longueur d'onde de la lumière utilisée, cet effet diminue et pour un trou d'aiguille de diamètre "zéro", on obtient l'intersection optique théoriquement la plus mince pour la longueur d'onde et l'ouverture numérique utilisées. Apparemment, il existe une plage d'env. 1 Airy qui, il est vrai, ne génère pas encore les intersections optiques les plus minces, mais qui n'est que très peu éloignée de la limite théorique. Du fait que l'intensité de la lumière admise augmente à peu près de façon quadratique avec le diamètre du trou d'aiguille, il est pertinent de ne pas trop fermer le trou d'aiguille afin d'éviter le parasitage des images. 1 Airy est un très bon compromis, que le Leica TCS SP5 règle automatiquement pour vous. Si vous souhaitez un diamètre plus petit ou plus grand, une boîte de dialogue est prévue à cet effet. Cela vaut la peine d'essayer les divers paramètres pendant une heure creuse et d'observer leurs effets.

10.2 Enregistrement de coupes optiques

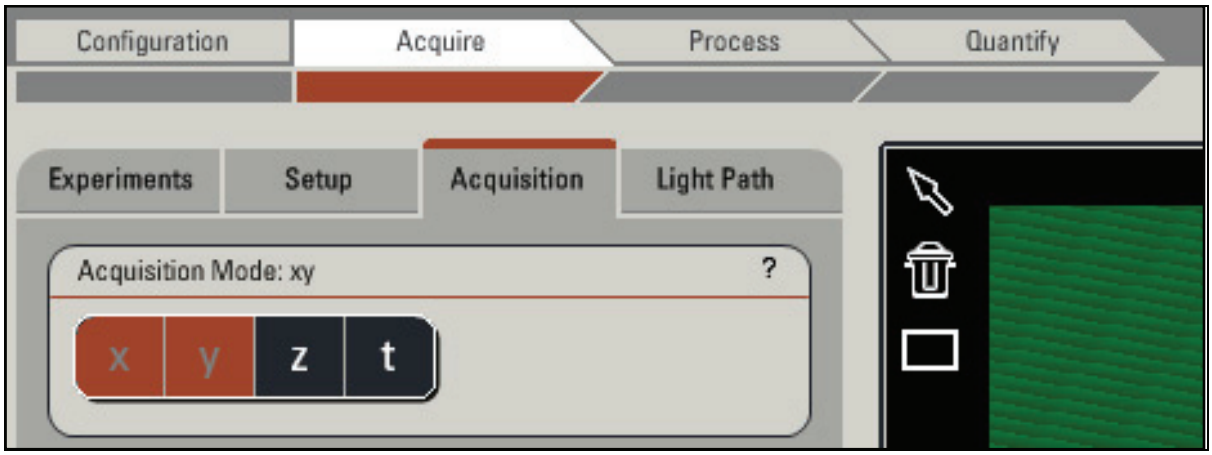


Figure 63 : L'enregistrement de données s'effectue dans toutes les applications Leica LAS AF grâce à la touche fléchée "Acquire".

Du fait que le Leica TCS SP5 offre de très nombreuses possibilités d'application, l'interface utilisateur contient toutes sortes de fonctions. Pour rendre le travail avec l'appareil encore plus efficace et simple, les fonctions momentanément superflues sont masquées. Dans le bord supérieur, il y a à cet effet une rangée de touches fléchées qui permettent de sélectionner les actions possibles. L'enregistrement de données (qui est le thème de ces chapitres) s'effectue avec le bouton "Acquire" (Figure 63). L'aide en ligne contient la description des fonctions individuelles.

Dans ce chapitre, nous allons maintenant décrire les éléments indispensables du réglage des principaux paramètres d'enregistrement et ce qu'il faut prendre en compte.

10.2.1 Enregistrement de données

L'enregistrement de données commence par l'activation de la touche "Live" (Figure 64). Les données sont transférées en continu à la mémoire vidéo et représentées sur le moniteur. Mais les données ne sont pas archivées tout de suite, de façon à être disponibles.

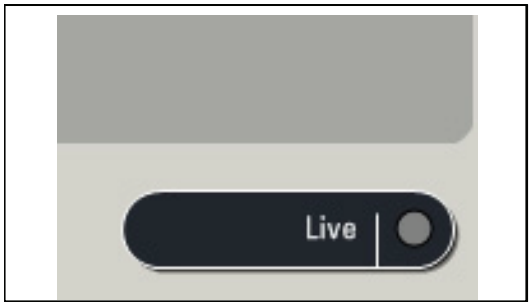
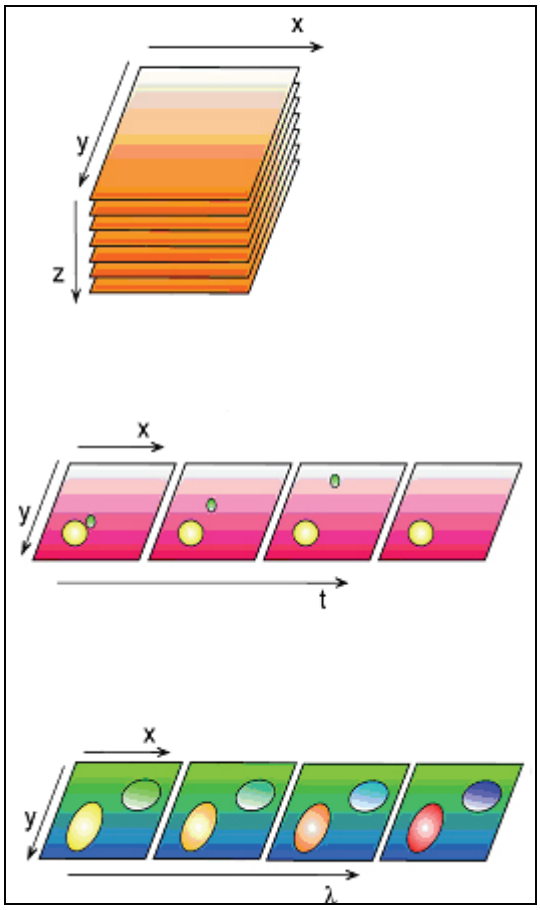


Figure 64 : Dans toutes les applications Leica LAS AF, la touche "Live" permet de démarrer l'enregistrement de données.

Il s'agit donc d'un mode Aperçu (Preview). Les réglages de l'appareil sont faits dans ce mode. Quand l'enregistrement des données est terminé, le balayage s'arrête aussitôt, même si la représentation de l'image est incomplète.

Il y a aussi la possibilité d'acquérir une image unique. Cette image est archivée dans l'expérience d'où il est possible de la rappeler ultérieurement ou de l'enregistrer sur le support de son choix. Cet enregistrement d'une image unique a l'avantage de ne solliciter l'échantillon qu'une fois mais son utilisation est plus compliquée s'il faut encore procéder à des réglages. Si le réglage de tous les paramètres est correct, on peut ainsi enregistrer l'image résultante. Des fonctions telles que l'accumulation ou la pondération sont applicables.

La troisième situation d'enregistrement des données est l'enregistrement d'une série pour laquelle les paramètres sélectionnés au préalable sont modifiés incrémentiellement entre les enregistrements individuels. Il est ainsi possible de créer des séries z, des séries chronologiques ou des séries lambda (Figure 65).



Piles Z

Série chronologique

Série lambda

Figure 65 : Enregistrement par lot pour les séries 3D, les séries chronologiques et les séries lambda

Si l'appareil fonctionne en "LiveDataMode", toutes les images enregistrées sont automatiquement mémorisées avec l'heure correspondante. Par conséquent, il n'y a pas de "Preview-Mode" (Figure 66).

Ce procédé convient très bien pour les objets vivants, quand l'on désire observer l'objet pendant un certain temps et entre-temps, modifier le milieu environnant, réaliser des stimulations électriques ou des modifications déclenchées par la lumière.

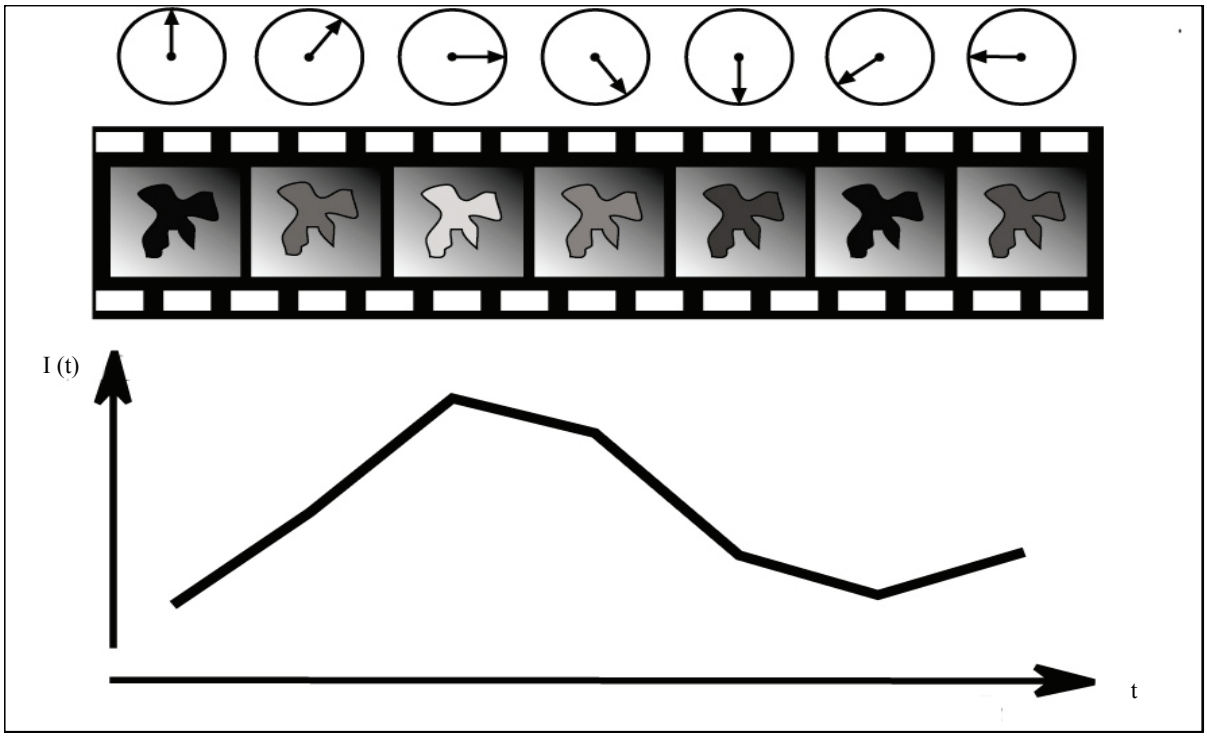


Figure 66 : En LiveDataMode, on peut enregistrer des données en continu tout en modifiant les paramètres de réglage, manipulant la préparation ou réalisant des séquences de décoloration. Le suivi chronologique porte sur l'intégralité de l'expérience et il est possible d'avoir une représentation graphique en ligne des modifications d'intensité dans les sites d'intérêt.

Les paramètres de réglage pour l'enregistrement d'une unique coupe optique sont décrits et discutés ci-après. Ces réglages sont identiques pour toutes les tâches réalisées avec l'appareil. Dans le cas de situations typiques pour les préparations, des jeux de paramètres préréglés sont archivés dans le logiciel. Il est également possible d'enregistrer et de rappeler des jeux de paramètres personnalisés. La description qui suit prend pour hypothèse que vous utilisez une préparation du type de la préparation standard jointe. La préparation standard est une coupe de rhizome de muguet pourvue d'une coloration fluorescente histologique. Cette préparation peut être utilisée pour de très nombreux problèmes fondamentaux et elle a l'avantage de ne presque pas décolorer.

10.2.2 Éclairage

Pour l'éclairage, il est possible de sélectionner les lignes laser appropriées pour l'excitation de la fluorescence. La régulation de l'intensité s'effectue en continu au moyen du coulisseau associé à la ligne laser. Quand le coulisseau est tout en bas, la ligne est désactivée. Le coulisseau permet de sélectionner en continu le réglage de l'intensité réalisé au moyen d'un filtre acousto-optique (AOTF). Pour préserver la préparation, il faut faire des essais et déterminer l'intensité suffisante pour que l'objet produise une image exempte de bruit. Cela dépend du colorant fluorescent et de la ligne utilisée, de la profondeur de la coloration de la préparation, du lieu et de la largeur de la bande d'émission choisie, de la vitesse de balayage et du diamètre du trou d'aiguille d'émission.

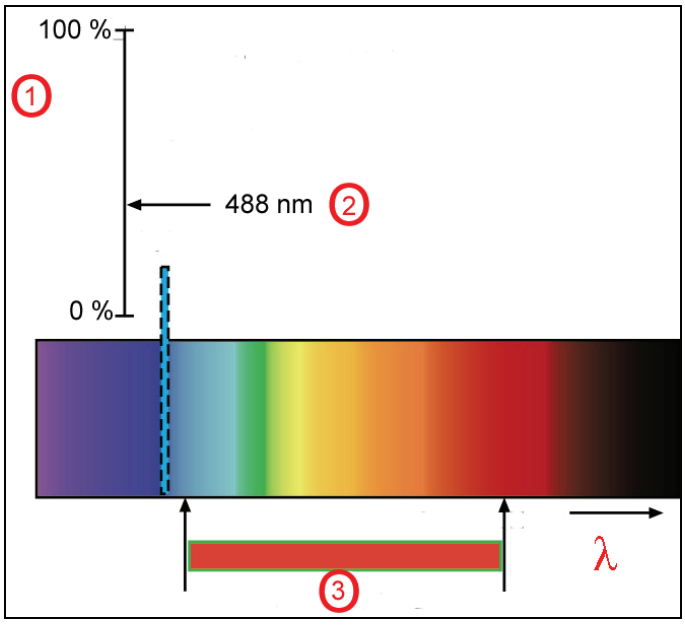


Figure 67 : Sélection de l'intensité d'éclairage (position 1) par filtre acousto-optique (AOTF, position 2) et sélection de la bande d'émission dans le détecteur SP (position 3).

Quand vous sélectionnez le jeu de paramètres "FITC", la ligne Argon 488 nm et une bande adéquate de 490 nm à 550 nm sont réglées.

L'interface utilisateur fournit la représentation graphique de l'intégralité du trajet optique. Du côté de l'émission, vous trouvez une bande spectrale avec des possibilités de réglage pour les bandes d'émission. Dès qu'une ligne laser est activée, cette ligne est visible à l'endroit approprié du spectre. Quand vous regardez l'échantillon au microscope : quand vous actionnez le coulisseau, vous voyez la lumière de la couleur choisie s'éclaircir ou s'assombrir. En cas d'utilisation conforme et de respect des consignes de sécurité, il n'y a aucun risque pour les yeux de l'utilisateur. Respectez une distance de sécurité d'au moins 20 cm entre vos yeux et l'ouverture de l'objectif. A cet effet, veuillez aussi lire les consignes de sécurité données dans le présent mode d'emploi.

Si tous les réglages sont en ordre, on peut voir sur le moniteur des images plus claires et plus sombres en actionnant le coulisseau de l'éclairage.

10.2.3 Division du faisceau lumineux

Dans le cas le plus simple, on sélectionne une ligne laser pour exciter un colorant fluorescent qui est presqu'au maximum du spectre d'excitation de ce colorant. Cela permet d'obtenir le meilleur rendement. En général, les lasers fournissent beaucoup plus de lumière qu'il n'est nécessaire et une diminution de 10 % est habituellement suffisante pour obtenir de bonnes images (cela dépend évidemment très fortement de la coloration de la préparation). Ainsi, l'on peut également exciter la fluorescence du côté bleu avant le maximum d'excitation, ce qui présente l'avantage qu'une bande plus large est disponible pour la collecte de l'émission (Figure 68).

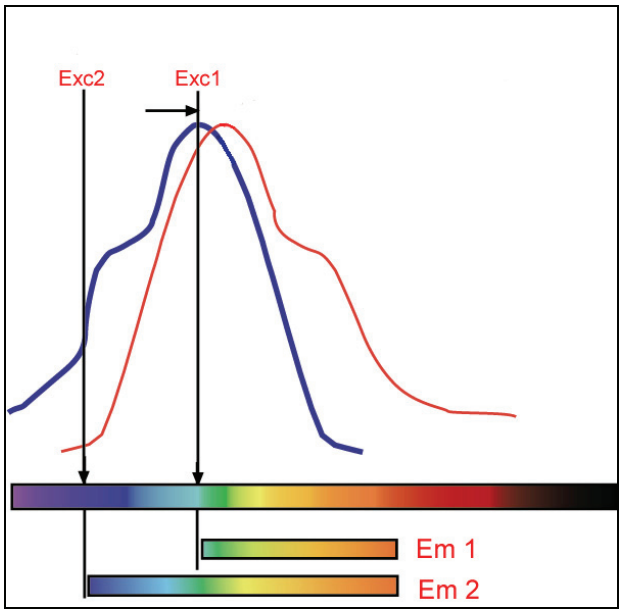


Figure 68 : Spectre d'excitation d'un colorant fluorescent (bleu) et spectre d'émission (rouge). Si l'on excite au maximum (Exc1), on ne peut collecter qu'une bande étroite du côté de l'émission (Em1). Lors de l'excitation dans la région bleue, où l'intensité du laser peut être élevée sans dommage, on peut utiliser une bande d'émission nettement plus large (Em2).

Cela vaut la peine de faire quelques essais. L'utilisation d'un répartiteur acousto-optique (Acousto Optical Beam Splitter, AOBS®) permet de faire très confortablement la mise en et hors circuit de toutes les lignes laser disponibles, sans avoir à se soucier des caractéristiques du répartiteur ou de la distance des lignes.

10.2.4 Bandes d'émission

Après que la lumière d'excitation ait atteint l'échantillon par l'intermédiaire de l'AOBS® et de l'objectif, l'excitation crée dans les molécules fluorescentes une émission dont la lumière est décalée vers des longueurs d'ondes plus longues (donc "rouges"). Ce décalage est appelé "Stokes Shift" ; il dépend du fluorochrome. Habituellement, les spectres d'excitation et de désexcitation des colorants fluorescents se recoupent et le Stokes Shift est la distance du maximum d'excitation au maximum d'émission. Quand le Stokes Shift est très élevé, cela favorise la séparation et le rendement. Les colorants typiques ont un Stokes Shift de 10 à 30 nm. Mais on peut avoir des valeurs supérieures à 100 nm, par exemple avec la chlorophylle naturelle, qui est un colorant extraordinaire pour les expérimentateurs curieux.

La représentation graphique de la bande spectrale fournie par l'interface utilisateur affiche les courbes d'émission des colorants. Il est donc très simple de sélectionner où une bande d'émission doit commencer et où elle doit finir. Si une courbe d'émission n'est pas mémorisée, on peut également l'enregistrer directement avec le système et l'archiver.

Une barre réglable sous la bande spectrale est attribuée à tout détecteur confocal. Les limitations à droite et à gauche de ces barres indiquent les limites pour la bande d'émission sélectionnée.

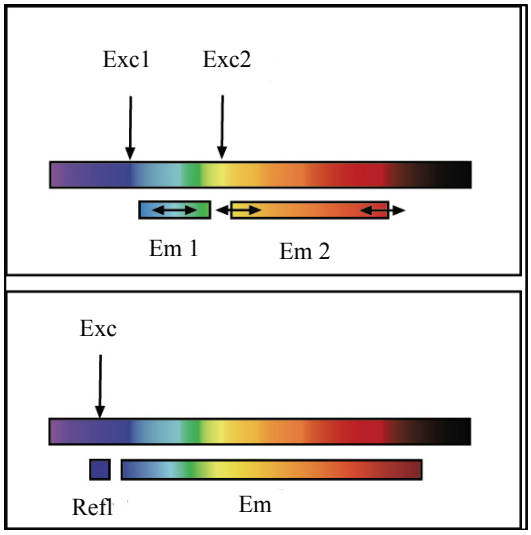


Figure 69 : Possibilités de réglage du détecteur SP pour 2 fluorescences avec des excitations différentes (haut) ou pour la fluorescence et la réflexion lors d'une excitation (bas).

L'on peut facilement faire glisser toute la barre dans un sens comme dans l'autre afin de régler la fréquence centrale. Tout comme l'on peut simplement déplacer les limitations. Il est ainsi très pratique de s'orienter par rapport aux lignes d'excitation et aux courbes d'émission affichées et d'adapter la bande d'émission avec le système de détection Leica SP®. Ceci est aussi possible pendant la capture d'images. C'est pourquoi l'on voit immédiatement l'effet du réglage sur l'image et cela permet de régler empiriquement les valeurs qui conviennent (Figure 69).

Dès que la bande d'émission croise sous la ligne d'excitation, la lumière d'excitation réfléchie est également représentée dans l'image. Ce n'est évidemment pas souhaitable pour la fluorescence, mais cela permet de créer très facilement une image de réflexion. La bande la plus étroite fait 5 nm et pour des mesures de réflexion, l'on règle en général cette bande de 5 nm en dessous de la ligne d'excitation.

Pour supprimer le brouillage de la lumière d'excitation réfléchie, il suffit en général de commencer le début de la bande d'émission à environ 3 - 5 nm du côté rouge de la ligne d'excitation. Cela dépend bien sûr beaucoup des propriétés réfléchissantes de la préparation. Pour cette raison, l'on doit également garder une plus grande distance quand l'on fait la mise au point à proximité de la surface en verre. Cela vaut tout particulièrement pour les préparations enrobées dans un milieu aqueux. Il faut s'attendre à une réflexion d'autant plus gênante que l'indice de réfraction du matériau d'enrobage s'écarte de 1,52. Ainsi, les préparations contenant un assez grand nombre de vésicules lipidiques ont besoin d'être traitées avec un soin particulier.

10.2.5 Le trou d'aiguille et son effet

L'utilisation des microscopes confocaux a pour raison d'être qu'ils permettent de créer des coupes optiques minces sans qu'un traitement mécanique de la préparation soit nécessaire. La partie principale de l'appareil qui crée ces coupes est un petit diaphragme placé devant le détecteur, appelé trou d'aiguille (Pinhole), et décrit précédemment au paragraphe 10.1.4. Dans l'idéal, le diamètre de ce trou d'aiguille est aussi petit que voulu, mais un trou trop petit ne laissera plus passer la lumière et de ce fait, aucune image ne pourra être générée. Mais si le trou d'aiguille a une trop grande ouverture, l'effet est perdu et de nombreuses parties de

l'image issues des régions de l'objet ou situées au-dessus ou au-dessous du plan de mise au point manquent de netteté.

La dépendance de l'épaisseur de la coupe optique par rapport au diamètre du trou d'aiguille est linéaire pour les grands diamètres ; avec de petits diamètres, elle se rapproche d'une valeur limite et elle est donc presque constante à proximité de zéro (Figure 70). La valeur limite dépend de la longueur d'onde de la lumière et de l'ouverture numérique. Du fait que l'ouverture du trou d'aiguille n'entraîne qu'une faible modification de l'épaisseur de coupe mais que la lumière admise augmente quadratiquement avec le diamètre, il est opportun de ne pas utiliser de diamètres trop petits.

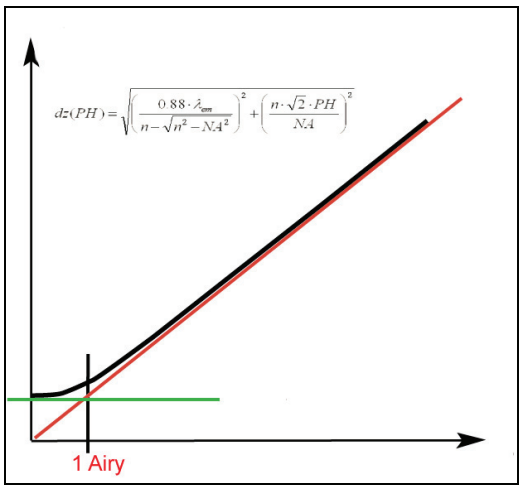


Figure 70 : Rapport entre l'épaisseur de coupe optique (axe y) et le diamètre du trou d'aiguille (axe x).

Il y a un bon compromis quand la limite de diffraction (dépendance constante) se transforme en limitation géométrique (dépendance linéaire). Le trou d'aiguille a à cet endroit, quand on le reproduit sur le plan de la préparation à peu près la taille du disque de lumière limité par diffraction d'un rayon focalisé. On appelle ce diamètre diamètre du disque d'Airy. Le diamètre du disque d'Airy se calcule facilement à partir de l'ouverture et de la longueur d'onde. Si l'on donne ainsi au trou d'aiguille la taille de la tache lumineuse limitée par diffraction, l'on obtient des coupes optiques nettes avec un bon rapport signal-bruit (S/N)
(Figure 71).

Bien sûr l'appareil peut calculer et régler tout seul cette valeur. L'objectif utilisé est connu des appareils entièrement automatiques et il est possible de le régler avec les systèmes manuels. Les lignes d'excitation utilisées sont également connues du système.

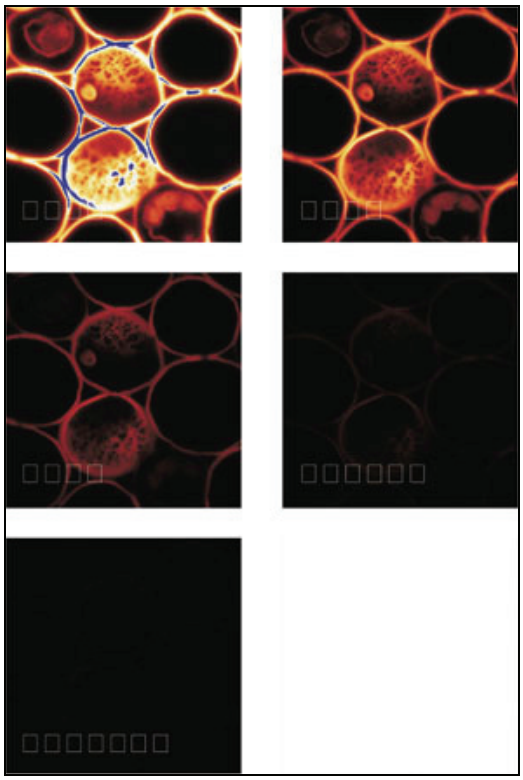


Figure 71 : Coupes optiques réalisées avec différents diamètres de trou d'aiguille (objectif 63x/1,4). Diamètre du trou d'aiguille, d'en haut à gauche à en bas à droite : 4 AE; 2 AE; 1 AE; 0,5 AE; 0,25 AE. Permet de repérer une forte perte de luminosité à de très petits diamètres et un arrière-plan important à de très grands diamètres.

C'est pourquoi un diamètre de trou d'aiguille de 1 Airy est toujours réglé en standard. En cas de changement d'objectif, le diamètre du trou d'aiguille est modifié d'autant automatiquement.

Dans les cas où l'échantillon n'est que faiblement fluorescent ou sensible à l'éclairage, l'on peut aussi agrandir le trou d'aiguille simplement en utilisant le coulisseau de l'interface utilisateur. De petits diamètres de trou d'aiguille sont bien sûr possibles quand la préparation est très claire. En particulier avec des échantillons réfléchissants, l'on peut fermer le trou d'aiguille jusqu'à un cinquième ou même un dixième d'unité Airy (AU) et créer des coupes aussi minces que possible.

10.2.6 Section d'image et réglages de la grille

Le microscope classique montre en fonction de l'objectif utilisé un cadrage circulaire de la préparation. Le diamètre de ce cercle, multiplié par l'échelle de reproduction de l'objectif est l'indice de champ. C'est donc un indice du microscope indépendant de l'objectif et il permet toujours en faisant l'opération inverse de calculer les dimensions de la préparation observée. Un scanneur observe toujours des cadrages carrés ou rectangulaires. Quand un carré de ce type est circonscrit par le champ de vision, la diagonale est à nouveau exactement l'indice de champ et l'on peut voir sur le moniteur l'image agrandie sans limitations.
Mais le scanneur peut, à la différence de l'œil humain ou d'un appareil habituel de prise de vues, être aussi réglé simplement sur un angle plus petit. Alors, un cadrage du champ de

vision s'affiche sur le moniteur avec un agrandissement supérieur. Sans autre optique, il est également possible de zoomer sur les détails. Du fait que les angles de balayage peuvent être très rapidement réglés en continu sur un champ plus large, il est possible d'obtenir un grossissement plus élevé, jusqu'à près de 40x, par un simple déplacement d'un coulisseau. Bien sûr, comme toujours avec les microscopes, le grossissement global doit être pertinent et il ne faut donc ni sous-évaluer ni surévaluer le grossissement requis si l'on veut obtenir des images réussies. Pour les aperçus et lors d'expériences avec décoloration, d'autres règles sont importantes.

Etant donné que l'on peut facilement se tromper en interprétant les données capturées, vous trouverez ci-dessous un exemple vous expliquant comment calculer le grossissement total requis et vous indiquant les informations fournies automatiquement par le logiciel à l'utilisateur :

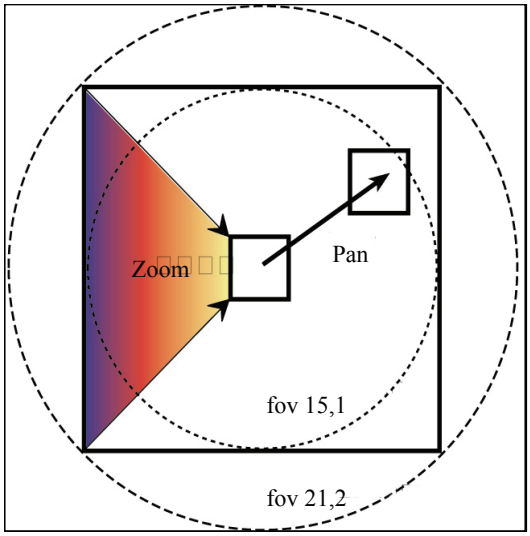


Figure 72 : Champs de vision pour le scanneur classique (auparavant : 21,2 mm, aujourd'hui : 22 mm) et le scanneur à résonance (15,1 mm). Un angle de balayage plus petit augmente le grossissement (zoom) et un décalage de balayage a pour effet de décaler la section d'image à l'intérieur du champ de vision (Pan).

La longueur d'arête du champ représenté avec le scanneur classique est de 15 mm, en l'absence de grossissement d'objectif (échelle 1x). Cela permet d'exploiter un indice de champ de 21,2 ou 22 (Figure 72).

Ceci convient pour la plupart des microscopes de recherche de bonne qualité. Combien de points sont donc effectivement résolus par voie optique dans cette dimension ? Cela dépend de l'ouverture numérique de l'objectif et de la longueur d'onde selon la formule d'Ernst Abbe : deux points peuvent encore être perçus séparément si la distance est au moins égale à d =ë/2*NA. Il s'ensuit qu'une ligne contient au plus 15 mm/d de points résolus (appelés resolved elements, "Resel"). Si nous prenons un objectif réel, p. ex. plan apochromatique 10x/0,4, la longueur d'arête est de 1,5 mm (15 mm/10) et d = 0,625 µm avec une lumière bleu vert d'une longueur d'onde de 500 nm. Cette image contient donc dans la direction x et la direction y 1 500/0,625 = 2 400 éléments résolus optiquement.

Pour transférer cette résolution dans une image matricielle composée numériquement de pixels, les données doivent être enregistrées avec une résolution deux fois plus élevée, afin d'éviter les pertes (théorème de Nyquist). L'image aurait donc 4800 x 4800 pixels. Les

puristes attendent même un triple "oversampling", donc 7200 x 7200 pixels, ce que l'on spécifie aujourd'hui par 52 mégapixels. Le format d'image se règle pour x et y avec une très grande finesse de graduations et indépendamment l'un de l'autre ; avec le Leica TCS SP5, des formats d'enregistrement jusqu'à 64 mégapixels sont possibles (8000 x 8000 points) (tab. 5).

Grossissement		**63**	**40**	**10**
Ouverture numérique		1,4	1,25	0,4
Résolution optique (400 nm)	µm	0,14	0,16	0,5
intermediate Image (Edge)	mm	15	15	15
Field (Edge)	µm	238	375	1500
Resel (Field / Resolution)		1667	2344	3000
Double Oversampling		3333	4688	6000
Triple Oversampling		5000	7031	9000

Tableau 5 Tableau des pixels résolus à 400 nm pour divers objectifs, observés sur l'intégralité du champ de balayage. On voit ici que 64 mégapixels (8000x8000 pixels) conviennent tout à fait pour une microscopie de grande valeur.

Avec ce réglage, l'on peut vraiment transférer en une seule image toute l'information de l'objet dont le microscope peut gérer la résolution. Cela crée bien sûr de grandes quantités de données, ce qui n'est pas souhaitable en particulier pour les mesures dont la haute résolution prend du temps. Ici, le zoom est la solution qui convient. Si l'on enregistre les données au format standard 512 x 512, pour éviter une perte d'informations, l'on doit comme dans l'exemple donné ci-dessus se limiter à un champ 10 à 15 fois plus petit. Avec un facteur de zoom de 10x et plus, l'on reçoit des données qui sont encore agrandies utilement mais avec des champs de vision très petits. Il s'agit ici de faire un compromis en fonction de l'information souhaitée.

Cette image est tout d'abord un cadrage au milieu du champ de balayage. Ceci n'est pas toujours souhaitable car un centrage aussi précis des structures intéressantes est difficile. C'est pourquoi l'on peut encore décaler sur tout le champ de balayage la zone effectivement utilisée pour le balayage ; ce procédé s'appelle "panning".

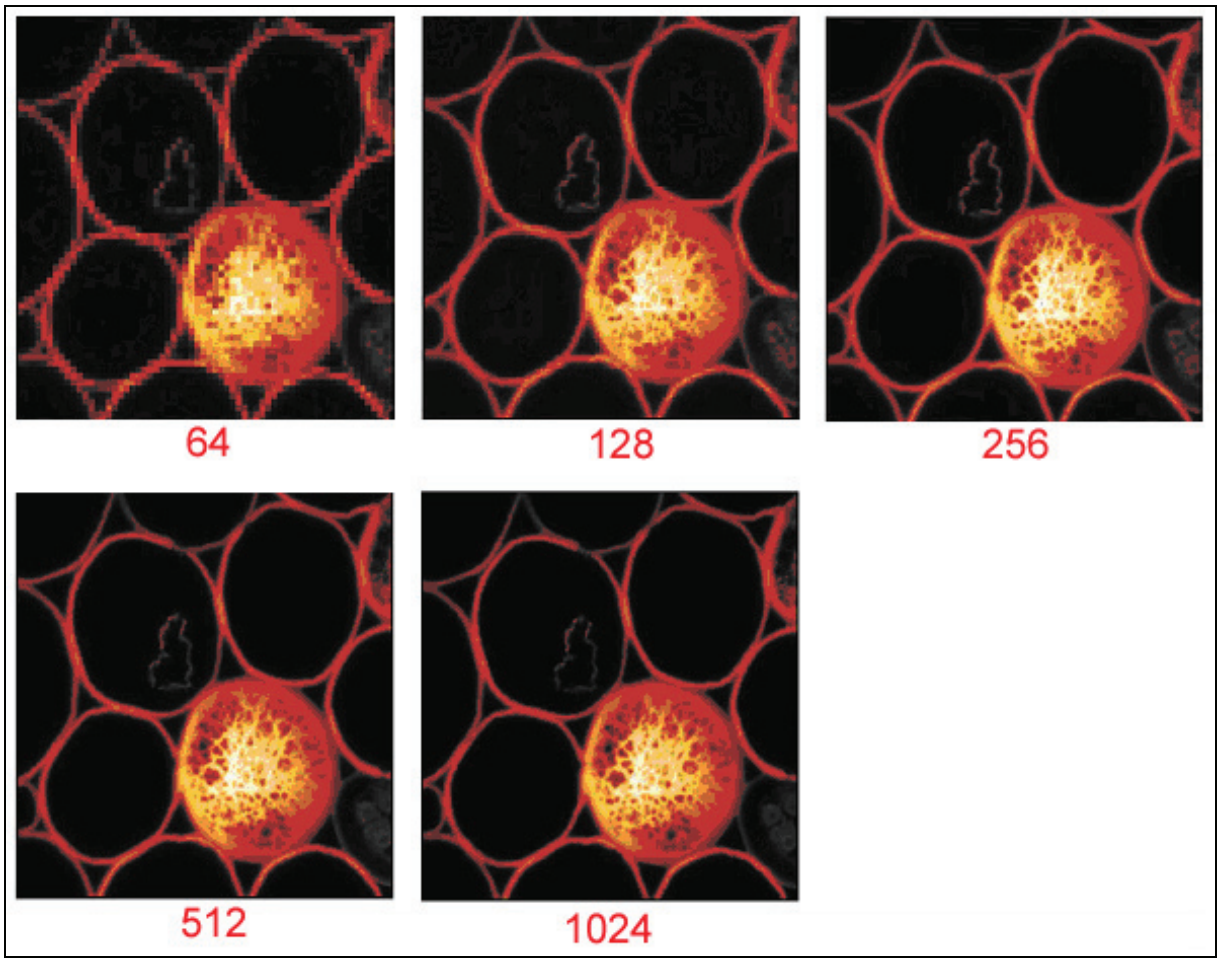


Figure 73 : Section d'image identique avec différentes résolutions de pixels. L'on constate souvent que le support d'impression est incapable de reproduire les résolutions. C'est pourquoi il vous sera probablement difficile de voir une différence dans les deux images du haut. Cependant, les différences relatives à la résolution optique sont énormes. C'est un élément à prendre en compte lors des publications.

Le plus simple est de combiner les deux procédés avec la fonction appelée "Zoom-In". Elle consiste à sélectionner sur le moniteur une case qui circonscrit les structures intéressantes et l'appareil règle alors automatiquement les valeurs Zoom et Pan adéquates. C'est très rapide et préserve ainsi la préparation. La fonction "Undo-Zoom" permet de revenir à l'état initial et de se concentrer rapidement par ex. sur un autre endroit du champ de vision.

Les dimensions des espacements de grille utilisés figurent parmi les informations sur les images. Sous la désignation "Voxelsize", il y a la distance des pixels en x, y et z. Les images calculées plus haut avec un zoom 1 auraient donc un espacement de grille compris entre 200 et 300 nm. Des distances plus grandes entraîneraient des pertes de résolution avec un objectif ayant une ouverture de 0,4 (Figure 73).

Pour les taux d'enregistrement d'images plus élevés, il importe d'avoir des formats rectangulaires. Un autre paramètre de réglage est ici nécessaire : la rotation du champ de balayage. Du fait que dans le Leica TCS SP5, la rotation du champ s'effectue de façon optique, les rotations de +/- 100 °sont sans effet sur la vitesse et les formats de grille possibles (Figure 74).

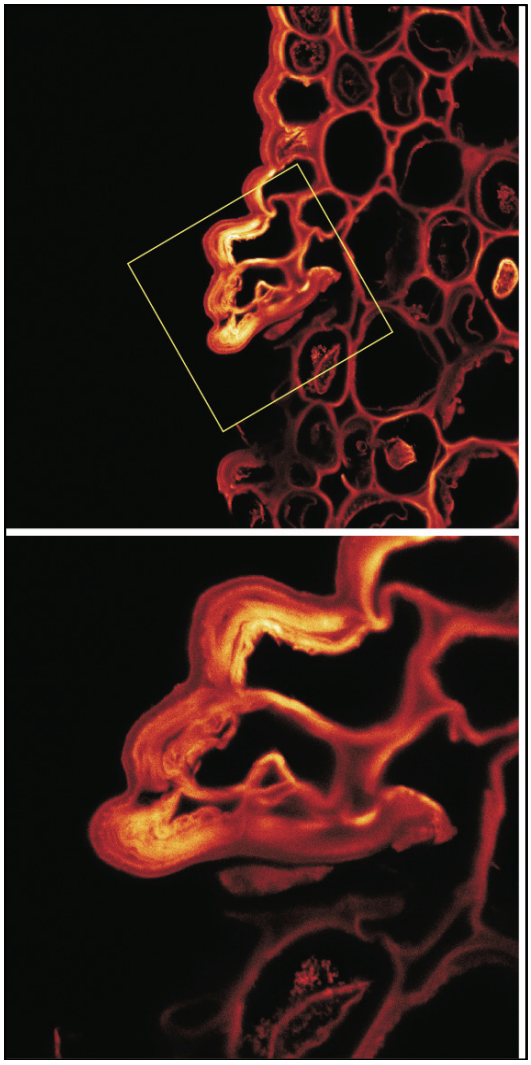


Figure 74 : Exemple présentant simultanément Zoom, Pan et Rotation.

Pour finir, il ne faut pas oublier de mentionner dans ce chapitre qu'une bonne image microscopique dans un contexte scientifique contient toujours une graduation. La graduation peut figurer simplement sur l'image et il est possible d'en adapter la forme, la couleur et la taille. Pour plus de clarté, la graduation a été omise dans ce document.

10.2.7 Signal et bruit

Lors de l'enregistrement de données, l'amplification du système d'enregistrement doit être adaptée à l'intensité du signal. Les intensités du signal varient sur plusieurs ordres de grandeurs et cette adaptation est nécessaire pour garantir une dynamique élevée lors de l'enregistrement. Le but est de répartir toute la plage des différences d'intensité sur les valeurs de gris utilisées. Lors d'enregistrements réalisés avec une numérisation de 8 bits, l'image reconnaît 256 valeurs de gris différentes (de 0 à 255). Quand le réglage de l'amplification est trop faible, l'on ne trouve le signal proprement dit que peut-être que sur 5 niveaux de gris, ce qui a pour effet que l'image affiche effectivement ces niveaux. Si le réglage de l'amplification est trop élevé, des parties du signal sont "découpées", c'est-à-dire qu'elles sont toujours représentées par la valeur de gris 255 bien qu'à l'origine il y ait eu des

différences et que ce signal contenait bien une information. Cette information s'est perdue (Figure 75).

Il est de plus important de déterminer correctement le point zéro. À cet effet, l'on éteint la lumière avec l'AOTF et l'on règle le signal sur le point zéro au moyen du réglage "Offset".

S'il y a alors un nouveau réglage de la lumière, on peut régler le renforcement de façon à éviter la saturation.

Pour pouvoir réaliser plus facilement ces réglages, des tableaux chromatiques spéciaux sont très utiles. Ainsi, "Glow-over/Glow-under" est un tableau chromatique qui utilise en premier lieu le jaune et le rouge pour les intensités, avec des nuances pour représenter l'intensité du signal. La valeur de gris zéro est représentée en vert et la valeur de gris 255 est représentée en bleu. Ces deux valeurs sont ainsi immédiatement reconnaissables. Le réglage du point zéro est correct si, lorsque la lumière est éteinte, près de la moitié des pixels ont la valeur zéro, et sont donc représentés en vert. Pour plus de sûreté, l'on peut élever l'offset d'une ou deux valeurs de gris afin que le signal ne soit pas coupé vers le bas. La perte de dynamique est négligeable (environ 0,4 % par valeur de gris à 8 bits).

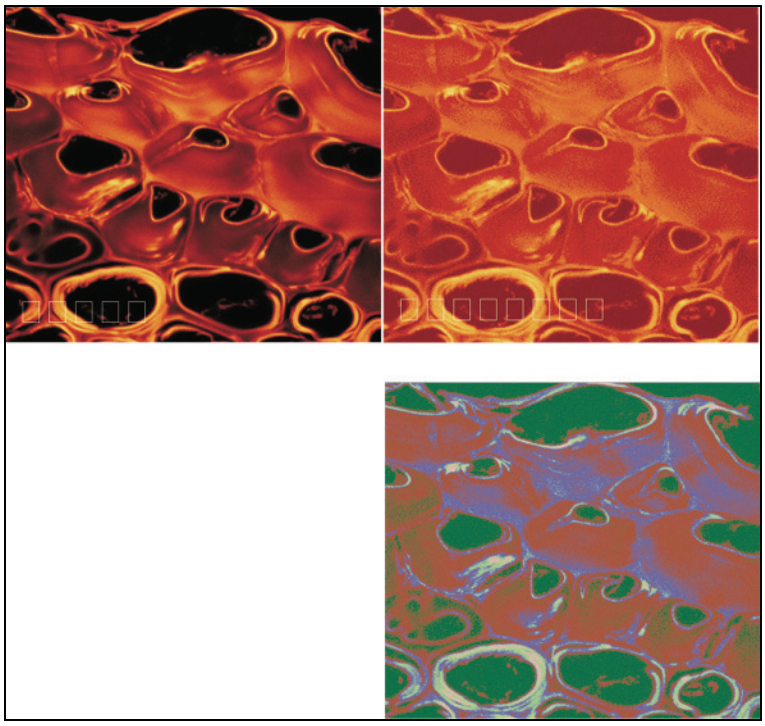


Figure 75 : En haut à gauche, prise de vues à 8 bits (256 niveaux de gris). À droite, le même objet avec une dynamique bien moindre. Sur l'image en fausses couleurs du bas, l'on discerne 6 niveaux de gris. C'est moins que 3 bits.

Les écarts électroniques par rapport au point zéro sont généralement insignifiants mais toutefois, il est pertinent de contrôler le réglage de temps en temps. Mais la signification spécifique du réglage de la valeur Offset est qu'une fluorescence non spécifique ou propre à la préparation peut être masquée dès l'enregistrement. Pour ce faire, l'on règle le décalage de façon à ce que la fluorescence d'arrière-plan disparaisse. Veuillez noter que des signaux contenant des informations risquent alors d'être coupés.

Ce réglage doit toujours être associé à un contrôle précis du résultat.

L'amplification du signal doit être effectuée après la correction de l'offset. Avec le tableau chromatique décrit, c'est très simple : en régulant la haute tension du photomultiplicateur, veillez à ce que les pixels bleus ne soient plus visibles. Il est recommandé de garantir par une focalisation que ce sont vraiment les signaux les plus clairs du champ d'image observé qui sont mis à contribution par le réglage. C'est ici le moment qui convient pour vérifier que la lumière d'excitation est correctement réglée. Pour réduire le bruit dans l'image, il est possible d'élever l'intensité de l'éclairage en réglant l'AOTF. Il faut toujours prendre en compte qu'une intensité d'éclairage plus forte endommage la préparation plus rapidement. Avec des échantillons très sensibles, et si l'on est particulièrement intéressé par de rapides changements d'intensité dans les objets vivants, on est volontiers prêt à accepter une image parasitée. Toutefois, le compromis dépend de l'échantillon et de l'application.

Outre l'intensité lumineuse, il y a encore d'autres possibilités d'influencer le rapport du signal au bruit : la vitesse d'enregistrement des données. Autant la vitesse de balayage à proprement parler, qui se règle avec la fréquence de lignes (de 1 à 1 400 Hz, seulement avec les scanneurs classiques), que le moyennage sont ici des possibilités d'améliorer le signal. La modification de la vitesse de balayage elle-même entraîne un moyennage des pixels car l'enregistrement des données sur chaque pixel prend du temps. Lors du moyennage des lignes, la même ligne est enregistrée plusieurs fois et le résultat du moyennage est représenté. Lors du moyennage de l'image, il y a toujours enregistrement d'une image complète et compensation au même endroit avec l'image suivante.

Tous les procédés ont, comme toujours, des avantages et des inconvénients : pour les objets mobiles, la corrélation temporelle est importante, donc un balayage plus lent est affiché. Par ailleurs, les phénomènes de triplet jouent en faveur de longs intervalles entre les moyennages, donc pour le moyennage d'images complètes. Le moyennage des lignes est un compromis. Le moyennage d'images complètes est le procédé qui a le plus grand effet de préservation mais il a toutefois pour inconvénient que l'on ne voit pas immédiatement la qualité du résultat, dont il est plus facile de faire l'évaluation avec d'autres procédés. Par ailleurs, lors du moyennage d'images, il est également possible de l'interrompre de façon interactive si on a l'impression que la qualité est suffisante. Il n'y a pas de recette valable pour toutes les applications. Il convient de trouver le procédé le plus approprié en faisant des essais et en se basant sur l'expérience acquise.

10.2.8 Coupes de profil

Nous avons jusqu'ici toujours pris pour hypothèse que les images sont enregistrées parallèlement au plan de mise au point. C'est également juste et pertinent pour la microscopie classique. Mais un système confocal de balayage point par point offre aussi de nouvelles possibilités d'enregistrement des données qui sont intéressantes. Si le déplacement du spot s'effectue toujours sur une seule et même ligne et si, au lieu d'un déplacement y incrémentiel entre les lignes, il y a déplacement du plan focal (par ex. avec la platine SuperZ de mise au point fine commandée par galvanomètre, qui est rapide et précise), l'on obtient à l'écran une coupe de profil de l'échantillon qui est à peu près comparable avec une entame de gâteau. Les systèmes basés sur des appareils de prise de vues ("confocaux" eux aussi) permettent de calculer ces profils seulement à partir de piles entières (Figure 76).

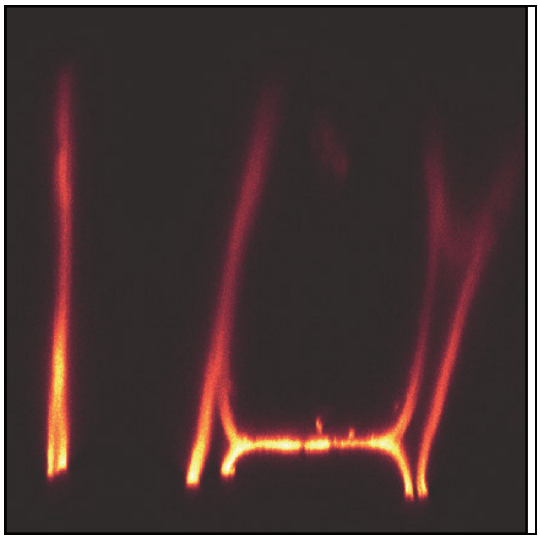


Figure 76 : Coupe de profil dans l'échantillon de muguet (Convallaria). L'épaisseur est d'environ 30 µm.

10.3 Fluorescence multiparamétrique

Dans de nombreux cas, on utilise aujourd'hui des préparations qui ont plus d'une coloration fluorescente. Les colorations multiples sont obtenues par hybridation avec des fragments aux couplages différents (hybridation fluorescente in situ, FISH), au moyen d'anticorps aux marquages différents ou avec des protéines fluorescentes ayant des propriétés spectrales différentes. Même les colorations fluorescentes classiques issues de l'histologie et l'autofluorescence sont des paramètres utilisables (Figure 77).

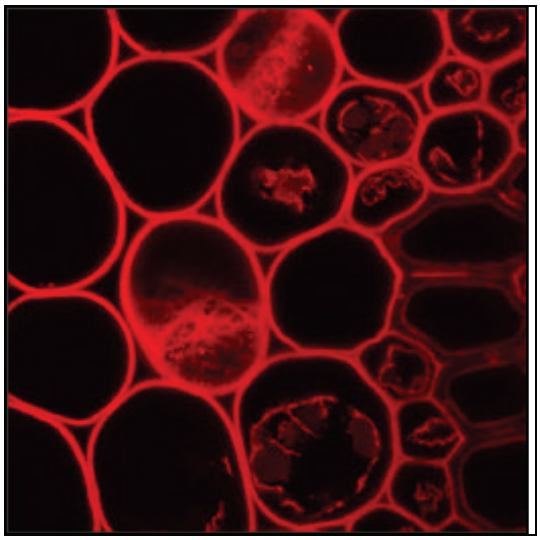


Figure 77 : Enregistrement simultané de 2 fluorescences qui ne sont excitées dans ce cas qu'avec une seule ligne laser. La représentation en vert et rouge est arbitraire.

10.3.1 Éclairage

Pour un échantillon aux colorations multiples, il est en général nécessaire de l'éclairer simultanément (ici, avec des lignes laser) avec plusieurs couleurs. Mais cela ne se passe pas toujours ainsi : il y a bien sûr aussi des colorants d'émissions différentes qu'il est pourtant possible d'exciter avec la même longueur d'onde. Un exemple marquant est par exemple une préparation botanique ayant une coloration FITC excitée dans le bleu. On peut alors voir l'émission d'isothiocyanate de fluorescéine dans la zone bleu vert du spectre. Mais cette même excitation agit simultanément sur la chlorophylle dont l'émission est mise en évidence dans la zone rouge foncé.

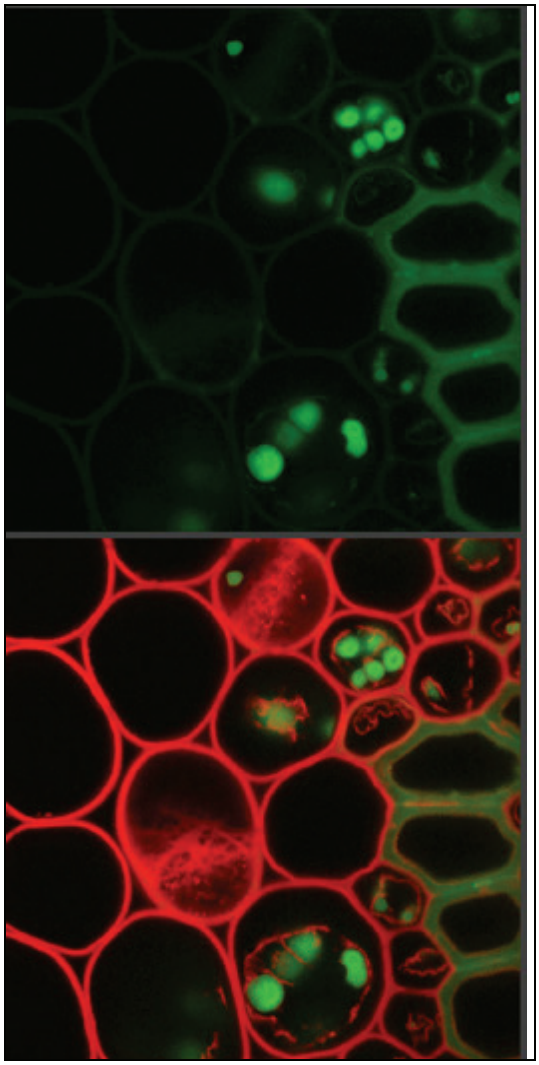


Figure 78 : Enregistrement simultané de 2 fluorescences qui ne sont excitées dans ce cas qu'avec une seule ligne laser. La représentation en vert et rouge est arbitraire.

La représentation simultanée d'images fluorescentes et de réflexion est également possible. Avec une excitation supplémentaire, l'on doit à cet effet observer seulement une seconde "bande d'émission" qui est située sous la ligne laser.

Mais normalement, il y a utilisation de colorants qui nécessitent des longueurs d'ondes d'excitation différentes. Dans ce but, divers lasers sont normalement intégrés à l'appareil.

Pour activer une ligne d'excitation additionnelle, il suffit de régler, selon la description faite pour l'excitation simple au paragraphe 10.2.2 en plus le coulisseau souhaité pour la seconde longueur d'onde. Il est tout aussi facile d'activer d'autres longueurs d'ondes d'excitation. Pour les expériences avec décoloration décrites plus bas, il est parfois utile d'activer plusieurs des lignes Ar, même si on n'enregistre pas de signal ou si on enregistre un signal seulement dans un canal. Il est ainsi possible d'élever l'intensité en plus.
Il est toujours intéressant d'essayer plusieurs combinaisons de laser. Constatation est souvent faite que quelques-unes des lignes sélectionnées pour les colorants sont inutiles. Ou bien une autre ligne s'avère être un meilleur compromis. Pour la plupart des combinaisons typiques de colorants, des préréglages de l'éclairage et de la division du faisceau lumineux ainsi que le réglage des bandes d'émission sont proposés et accessibles dans une liste.

10.3.2 Division du faisceau lumineux

Dans les systèmes AOBS®, la description de la division du faisceau lumineux est très simple car il est inutile de s'en soucier. L'AOBS active automatiquement pour les lignes sélectionnées une bande étroite de façon à ce que l'excitation atteigne l'échantillon. Ces bandes ont une largeur d'à peu près 2 nm. Tout le reste est disponible pour l'enregistrement de l'émission.
Avec les appareils équipés de répartiteurs optiques classiques, l'on doit sélectionner le répartiteur optique adéquat. Il est important de savoir qu'il existe non seulement des répartiteurs optiques simples, mais aussi des doubles et des triples. (DD et TD pour double dichroïque et triple dichroïque).
Les lignes adjacentes ne sont pas utilisables avec des répartiteurs dichroïques. Ainsi, il n'y a pas sur le marché des répartiteurs utilisables pour l'utilisation simultanée de lignes HeNe de 594 nm et 633 nm. L'AOBS est ici un net avantage : avec les bandes très étroites (d'1 à 2 nm), il permet d'activer les deux lignes pour l'excitation et même d'enregistrer encore une bande d'émission de 35 nm avec le détecteur SP.

10.3.3 Bandes d'émission

Les mêmes conditions de compatibilité que celles décrites au paragraphe 10.2.4 valent bien sûr pour les bandes d'émission - à la différence près que maintenant pour tous les colorants jusqu'aux plus rouges d'entre eux, deux lignes laser délimitent la bande et qu'il faut donc vérifier en conséquence que la lumière d'excitation n'atteint pas le détecteur. De plus, l'effet négatif du crosstalk peut influer fortement sur le choix des limites de fréquence. Le chapitre suivant explique cela en détail. Le réglage des bandes est expliqué au chapitre 10.2.

10.3.4 Crosstalk

Les spectres d'émission des colorants (même des colorants responsables de l'"autofluorescence") ont typiquement une allure très simple, avec un maximum d'émission et une inclinaison plus abrupte sur le flanc bleu que du côté rouge. L'émission se poursuit encore loin des deux côtés, mais une amplitude très faible. C'est le côté rouge qui pose surtout un problème. Crosstalk ("diaphonie" ou "Bleed-through") signifie que l'émission d'un colorant contribue au signal non seulement dans un canal, mais aussi dans les autres canaux de détection. C'est bien sûr à éviter dans une expérience car ce crosstalk fait

s'afficher à l'écran des résultats incorrects et fausse les calculs de corrélation. Tout comme l'évitement du crosstalk, un autre sujet d'importance consiste à rendre sûre la séparation.

Il est possible de prendre en compte plusieurs paramètres pour y parvenir : intensité lumineuse, sélection du laser, enregistrement séquentiel, bandes d'émission et procédé d'Unmixing. Nous nous occupons maintenant des paramètres d'éclairage et d'émission.

Souvent, le crosstalk est dû au fait que les concentrations des fluorochromes utilisés sont très différentes. Avec un éclairage homogène, le colorant le plus concentré produira un très bon signal mais il causera aussi très probablement des perturbations dans l'autre ou les autres canaux. Pour y remédier, on peut régler les diverses intensités de laser de sorte que le colorant peu concentré soit excité avec une intensité élevée et que le colorant très concentré le soit avec une faible intensité. Un tel équilibrage permet souvent d'éliminer un problème de diaphonie conséquent. À l'aide du réglage en continu de l'intensité offert par l'AOTF, on peut suivre le résultat directement à l'écran et faire ainsi un réglage en ligne pertinent en fonction des informations reçues.

Afin d'avoir une latitude suffisante pour le réglage des bandes d'émission, cela vaut la peine de faire des essais d'excitation avec des lignes laser différentes. Pour l'équilibrage, il est également possible d'utiliser ce paramètre : quand un colorant est très dominant, en choisissant une autre ligne d'excitation, on peut réduire l'intensité de cette coloration (et améliorer ainsi la séparation par rapport à l'autre colorant) et agrandir simultanément la distance par rapport à l'autre excitation, ce qui permet d'avoir des bandes d'émission plus grandes et accroît ainsi la sensibilité. Toute amélioration dans cette direction permet de réduire encore l'énergie de l'excitation, ce qui entraîne une moindre décoloration.

Une autre possibilité de réglage pour éviter la diaphonie consiste bien sûr à choisir des bandes d'émission adéquates. Les courbes d'émission des colorants utilisés sont représentées dans l'interface utilisateur et on gagne déjà beaucoup en limitant les bandes d'émission aux régions sans chevauchement, tout au moins dans le graphique affiché à l'écran. Évidemment, une courbe gardée en réserve ne correspond pas forcément à l'émission effective car de nombreux facteurs (p. ex. valeur pH, polarité, métabolites) peuvent décaler ce spectre. Mais là aussi, il est possible de modifier et d'optimiser les réglages pendant l'enregistrement de données.

10.3.5 Enregistrement séquentiel

Une autre possibilité de réduire la diaphonie consiste à enregistrer les informations pour les divers colorants non pas simultanément, mais successivement. Cela présente deux avantages : quand il y a utilisation de lignes laser différentes pour l'excitation (ce qui se produit en règle générale), un enregistrement séquentiel permet d'obtenir une séparation nettement meilleure car en premier lieu un seul colorant est excité et l'émission ne provient donc que de ce colorant, indépendamment de la région du spectre où le signal a été enregistré. C'est bien sûr le cas idéal, souvent l'autre colorant est un peu excité lui aussi mais la séparation est nettement meilleure qu'avec un enregistrement simultané. On peut ainsi la plupart du temps éviter le crosstalk presque complètement.

Un autre avantage du procédé séquentiel est qu'il permet de faire un réglage étendu des bandes d'émission des colorants. Cela a pour effet d'améliorer la sensibilité et de préserver la préparation.

Un inconvénient manifeste est qu'avec deux colorants, l'enregistrement dure deux fois plus longtemps, mais cet inconvénient est compensé par les avantages précités.

10.3.6 Unmixing

Comme dans la plupart des cas, il y a aussi une solution logicielle pour la diaphonie, quand la séparation physique n'est plus possible. Il est toutefois recommandé de faire avec des moyens instrumentaux une séparation aussi étendue que possible (voir 10.3.4et 10.2.5) et de n'utiliser les solutions informatiques que si le résultat obtenu est encore insatisfaisant.

Le procédé d'Unmixing ("démixage") détermine les portions d'émission d'un colorant qui sont réparties dans les divers canaux d'enregistrement. On procède pareillement avec les autres colorants. Il en résulte l'obtention d'une matrice de répartition que l'on peut utiliser pour redistribuer les intensités de signal en fonction des colorants respectifs. La méthode est expliquée pour deux colorants dans les figures ci-contre mais elle vaut pareillement pour un nombre quelconque de colorants. La condition préalable est que le nombre de canaux utilisés est au moins aussi grand que le nombre de colorants impliqués. Ainsi, les méthodes simples des systèmes d'équations linéaires permettent de faire une redistribution correcte des portions.

Mais la tâche essentielle d'un bon démixage consiste à déterminer les coefficients de la matrice. Là encore, le logiciel Leica met divers procédés à la disposition des utilisateurs. Afin de déterminer le procédé adapté à la tâche fixée, il est pertinent de faire quelques essais. Puisque toutes les données de mesure sont affectées d'une certaine marge d'erreur et d'un pourcentage de bruit, il n'y a pas de recette miracle permettant de trouver l'ultime vérité.

Le plus simple pour l'utilisateur consiste à déterminer les coefficients à partir des données statistiques des images enregistrées. Ce procédé détermine les coefficients avec des méthodes statistiques à partir des diagrammes de dispersion des deux canaux. Il incombe alors à l'utilisateur de déterminer la puissance d'activation de la séparation. Il existe deux procédés de séparation : un "souple" et un "dur".

Quand les coefficients sont connus suite à d'autres expériences, on peut entrer manuellement les données dans une matrice. Ce procédé convient également pour les tentatives manuelles d'amélioration, quand il faut compenser manuellement les perturbations d'arrière-plan ou les autofluorescences.

Le procédé qui donne les résultats les plus corrects est la "Channel Dye Separation". Ici, les répartitions des colorants spécifiques dans les divers canaux sont déterminées directement avec des données de référence colorées individuellement. Il est important que les paramètres réglés sur l'appareil ne soient plus modifiables, car bien sûr l'intensité du laser et l'amplification sur le photomultiplicateur influent sur ces coefficients.

Le procédé "Spectral Dye Separation" a recours aux spectres d'émission des colorants utilisés, qu'ils soient connus de par la littérature ou mesurés directement sur l'appareil, afin de calculer l'intensité relative des colorants. Ce procédé convient particulièrement quand les colorants ne modifient pas considérablement leur émission in situ et quand les données sont bien connues.

10.4 Séries 3D

S'il y a déplacement de la position du foyer entre deux enregistrements, l'on peut enregistrer une série complète de coupes optiques qui représentent la structure dans un bloc de données tridimensionnel. Bien sûr, il n'est pas possible de regarder directement cette "image" tridimensionnelle mais elle contient l'information spatiale des structures examinées et, en cas de colorations multiples, leur lien spatial.

10.4.1 Pile z

Pour enregistrer ces séries 3D ("piles z"), on détermine simplement les limites supérieure et inférieure en procédant ainsi : déplacement manuel au-dessus de la préparation, marquage de cet endroit, déplacement au-dessous de la préparation et marquage de la position. Il suffit alors de déterminer le nombre de coupes à enregistrer entre ces deux positions et l'appareil s'occupe du reste.

10.4.2 Épaisseurs de coupe

Comme il a été décrit aux sections 10.1.4 et 10.2.5, l'épaisseur de la coupe optique dépend de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique de l'objectif. Et bien sûr, du diamètre du trou d'aiguille. Le lien entre ces paramètres est établi par la formule décrite ici. Pour créer de bonnes coupes (c'est-à-dire minces), il faut que l'ouverture soit la plus grande possible. C'est pourquoi en microscopie confocale, on n'utilise que des objectifs à ouverture élevée. La longueur d'onde de l'émission est en général comprise entre 450 nm et 600 nm, ce qui correspond grosso modo à 500 nm. Si l'on choisit le diamètre de trou d'aiguille d'1 Airy, on obtient des épaisseurs de coupe comprises entre 0,5 μm et 2,5 μm pour des ouvertures de 0,7 à 1,4. Dans la pratique, ce sont des valeurs typiques. Dans la littérature, en particulier dans les matériaux publicitaires, on indique souvent une épaisseur nulle pour des coupes en réflexion avec un diamètre de trou d'aiguille, cette valeur est bien plus petite et fait donc "meilleur effet" mais elle n'est pas pertinente pour la pratique en microscopie de fluorescence.

10.4.3 Distances

Pour l'enregistrement dans une pile z, l'épaisseur des coupes optiques joue un rôle. Si les distances entre les enregistrements sont trop grandes (supérieures à l'épaisseur de coupe), le bloc de données présente des lacunes et il y a une perte d'informations. Il n'est alors plus possible de calculer correctement une reconstruction. D'un autre côté, il n'est pas raisonnable d'enregistrer autant de coupes que l'on veut parce qu'avec de très petites distances, les différences d'information d'une coupe à l'autre sont toujours plus petites et il y a ainsi production de nombreuses données inutiles. Cela se passe sur l'axe z exactement comme avec le "grossissement vide" du microscope usuel. Pour un enregistrement épais sans lacunes, mais aussi sans *oversampling* indésirable, l'on utilisera des distances entre les enregistrements qui sont environ la moitié ou le tiers de l'épaisseur de coupe optique. Dans la pratique, cela représente 0,7 - 0,2 μm. Il y a donc enregistrement d'1 à 5 coupes par micromètre en z, essentiellement en fonction de l'ouverture de l'objectif utilisé.

10.4.4 Quantités de données

Lors de l'enregistrement de séries, il faut par ailleurs tenir compte du fait que dans certaines circonstances, de très grandes quantités de données sont produites, qui ne peuvent être traitées que très lentement. Une image "normale" de 512 x 512 pixels et un canal occupe avec la résolution en niveaux de gris standard de 8 bits un volume de 0,25 Mo. Des centaines de ces images (soit à peu près une préparation d'une épaisseur de 20 µm à haute résolution), occupent déjà 25 Mo, ce qui était il y a quelques années à peine une quantité de données très difficile à gérer. Si maintenant il y a enregistrement en parallèle de 5 canaux et si le format d'image est de 1000 x 1000 pixels, cette pile fait déjà 500 Mo, soit presque la capacité d'un CD courant. Avec une profondeur des niveaux de gris de 16 bits et 8000 x 8000 pixels, on obtient un bloc de données de 64 Go, ce qui reste indigeste pour la plupart des ordinateurs actuels. Il convient donc de faire preuve d'esprit critique quant aux paramètres d'enregistrement des données.

10.4.5 Représentations

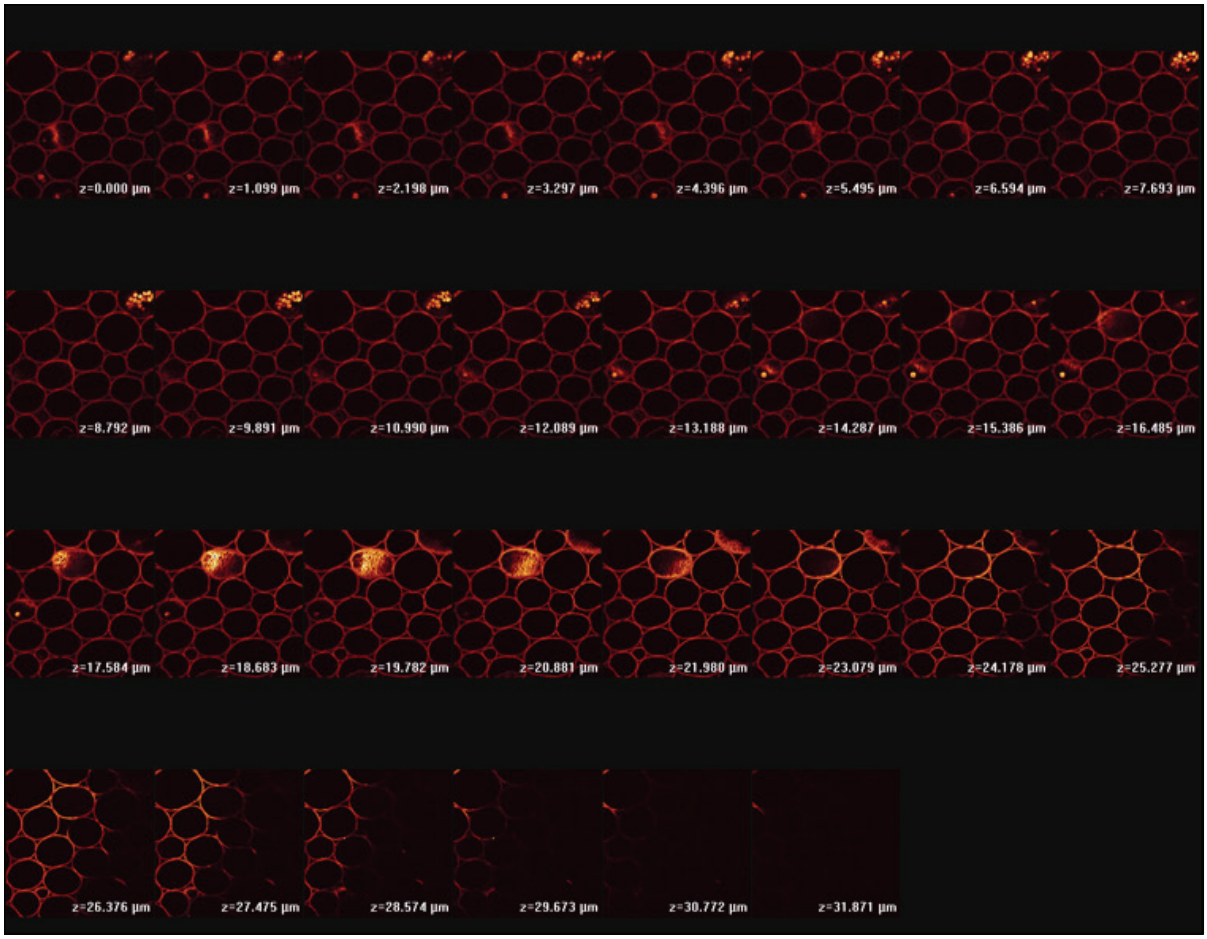


Figure 79 : Galerie d'une série z. Cette "collection de timbres-poste" convient particulièrement pour les publications monochromes.

Comme il a été mentionné précédemment, la représentation d'une image tridimensionnelle sur un moniteur bidimensionnel n'est pas vraiment possible. C'est pourquoi il existe plusieurs procédés permettant de présenter ces informations.

10.4.5.1 Galerie

Le plus simple consiste à ranger toutes les coupes d'une série dans une galerie, tout comme on le ferait d'une collection de timbres-poste (Figure 79). L'on peut ainsi analyser les changements de coupe en coupe et les représenter dans un journal.

10.4.5.2 Films

Actuellement, de nombreuses publications sont également proposées sur Internet sous forme électronique et on publie aussi des films dont le déroulement des séquences s'effectue à une vitesse agréable. Le spectateur a ainsi l'impression de faire directement au microscope la mise au point de la préparation. Ces deux procédés conviennent aussi bien pour les enregistrements monochromes (noir et blanc) que pour ceux réalisés sur plusieurs canaux.

10.4.5.3 Projections orthogonales

Une autre façon de comprimer la totalité de l'information (avec perte d'information) à deux dimensions consiste à calculer les projections à partir de la série entière. Le procédé le plus connu s'appelle la projection maximum. On cherche ici à déterminer la valeur la plus claire pour chaque pixel le long de l'axe z et on l'entre à cet endroit dans l'image résultante. On obtient ainsi une image composée uniquement de valeurs correspondant à un réglage d'une grande netteté et cela même, sur toute la distance de l'enregistrement en direction z.

Cette opération a donc permis d'augmenter la profondeur de champ sur toute la hauteur de la pile z. C'est pourquoi l'on nomme ces projections des images à "profondeur de champ étendue" ("extended depth of focus"). Avec ce procédé, il est également possible de traiter les enregistrements sur plusieurs canaux.

Si l'on colore maintenant chaque coupe différemment, en reproduisant l'arc-en-ciel sur l'axe z par exemple, il est possible de lire immédiatement à partir de cette projection la position en z des structures. Cela ne fonctionne bien sûr qu'avec un canal car la couleur est utilisée pour la hauteur. Cette représentation s'appelle "Profondeur de champ étendue par un codage en couleur de la hauteur" (height-color coded extended depth of focus) (Figure 80).

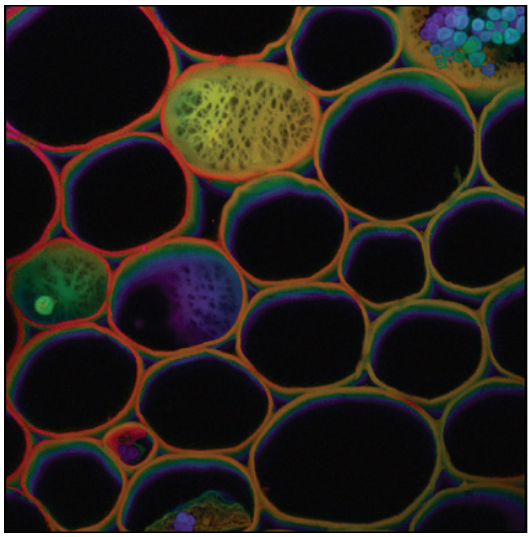


Figure 80 : Profondeur de champ étendue par un codage en couleur de la hauteur pour la série représentée ci-dessus.

Le procédé SFP (simulated fluorescence projection) utilise des approches plus complexes qui donnent des images très impressionnantes contenant des ombres portées. De toute façon, il faut ici toujours faire un contrôle précis de la quantification.

10.4.5.4 Projections orientées

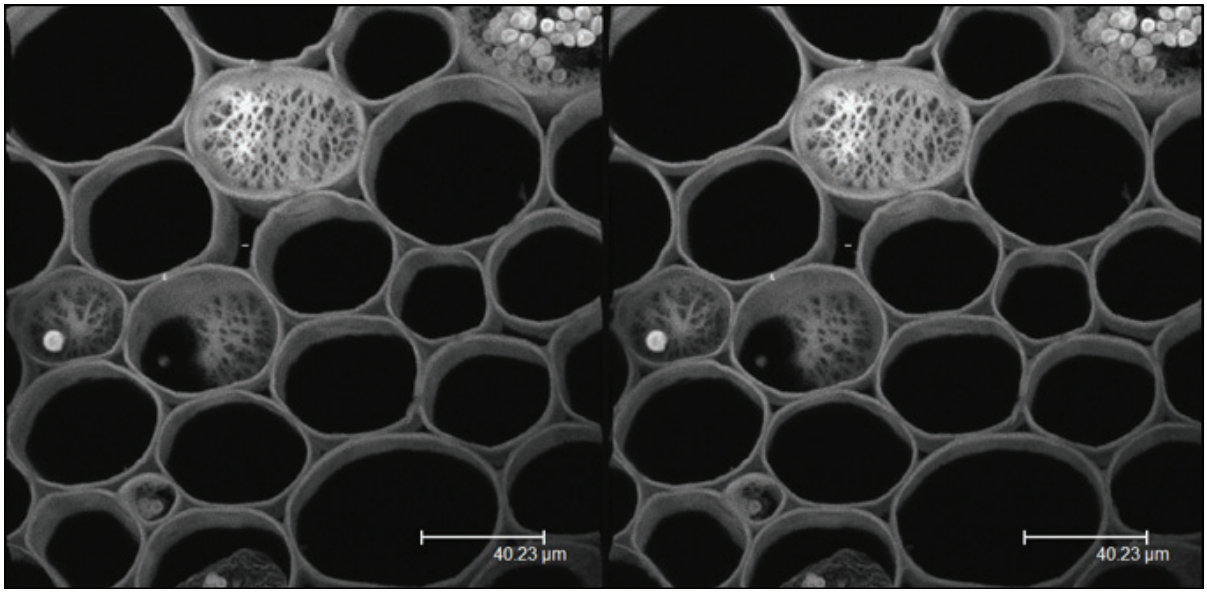


Figure 81 : Image stéréo des mêmes données 3D. Un peu de pratique est nécessaire mais cet investissement est rentable pour tout adepte de la microscopie confocale.

Dans les procédés décrits à la section 10.4.5.3, il est supposé en premier lieu que la projection s'effectue le long de l'axe visuel. Mais étant donné que les données informatisées ont une homogénéité spatiale, l'on peut aussi créer des projections à partir des directions de son choix.

Dans le plus simple des cas, il est ainsi possible de représenter côte à côte deux projections qui ont été calculées avec une petite différence d'angle et que l'on superpose par défaut d'alignement angulaire ("unaided fusion"). Le cerveau humain crée à partir de là une image en relief, comme il le fait avec tous les objets perçus par les deux yeux (Figure 81).

En cas d'utilisation d'un canal unique, l'on peut également représenter les deux vues avec différentes couleurs et les observer ensuite avec des lunettes équipées de filtres chromatiques (" anaglyphe rouge-vert"). Cette méthode est plus simple pour la plupart des observateurs mais elle n'est pas utilisable avec des données multiparamétriques.

Tout comme les coupes elles-même, il est aussi possible de calculer des séries de projections avec un angle progressif et d'en faire un film. Ces films 3D sont actuellement la forme la plus courante et la plus convaincante de représentation des données en relief.

10.5 Séries chronologiques

Un microscope confocal à balayage laser enregistre les images comme un appareil de prise de vues. Pour cette raison, il permet aussi d'enregistrer des séries temporelles, pour ainsi dire une pile z sans changement de z. De telles expériences Time-Lapse représentent un outil très important dans les secteurs de la physiologie et de la biologie du développement, dans lesquels les processus dynamiques sont d'un intérêt primordial.

10.5.1 Vitesse de balayage

Bien sûr lors de procédures dynamiques, en particulier lors d'examens cinétiques de processus biophysiques cellulaires, la résolution temporelle est un paramètre important. Mais il y a malheureusement des limites : d'une part la vitesse mécanique des scanneurs et la largeur de bande des lignes de transmission de données ; d'autre part tout simplement la quantité de photons que l'on peut espérer de la préparation pendant la période d'observation. Il y a en principe des solutions aux problèmes mécaniques et informatiques - d'autant plus que de grands progrès ont été réalisés ces dernières années - mais la limitation par la lumière reste un obstacle insurmontable. Une faible luminosité donne un mauvais rapport signal-bruit et donc des images trop mauvaises (dont la résolution est également mauvaise). C'est pourquoi il faut revérifier les paramètres à mesurer. Une différence très importante entre les diverses mesures est la dimensionnalité qui essaie de compenser les limitations mécaniques.

10.5.2 Points

On peut obtenir la résolution temporelle la plus haute en ne bougeant pas du tout le mécanisme du scanneur. On mesure ainsi le changement d'intensité lumineuse sur un point fixe sélectionné au préalable. Avec le Leica TCS SP5, cela s'effectue avec une résolution temporelle de 40 MHz (correspondant à 25 ns). Bien sûr, on doit aussi tenir compte du fait qu'à ce point la préparation se décolore très rapidement.

10.5.3 Lignes

La limitation aux images provenant d'une seule ligne est moins rapide, mais elle convient toutefois pour de nombreux processus à la dynamique élevée. Les données sont représentées en une image xt, où la première dimension est le lieu (la ligne sélectionnée) et la seconde dimension, le temps. Avec un scanneur à résonance de 8 kHz, il est ainsi possible en mode bidirectionnel d'avoir une résolution 16 kHz (63μs).

10.5.4 Surfaces

Le cas standard est l'enregistrement d'images xy en tant que série t. Ici, la résolution temporelle dépend de la vitesse du scanneur et du nombre de lignes par image. En se limitant à une image linéaire de 16 lignes, il est ainsi possible d'enregistrer avec un scanneur à résonance jusqu'à 200 images par seconde (5 ms).
Cette procédure d'enregistrement habituelle (généralement avec 512 x 512 pixels) est également utilisée pour les expériences de longue durée au cours desquelles

l'enregistrement de la préparation s'effectue sur de longues périodes, pendant des heures, voire même des jours, afin de suivre le développement des embryons ou des cultures cellulaires. Ici, les limitations de vitesse d'origine mécanique et photonique ne jouent qu'un rôle secondaire, c'est pourquoi le système doit être très stable, exempt de dérive et climatisé.

10.5.5 Dimensions (Time-Space)

Le développement tridimensionnel des structures en biologie présente évidemment un grand intérêt. Ici, le grand domaine d'application de la microscopie 4D s'est entre-temps implanté. Les piles z sont enregistrées séquentiellement et servent à faire des films "3D-temps". L'avenir nous réserve dans ce domaine passionnant de nombreuses innovations et des résultats captivants.

10.5.6 Mesures FRAP

Un tout autre domaine d'application de la microscopie à balayage laser est celui des examens dynamiques où un système est mis en déséquilibre par une perturbation et où l'on examine ensuite comment s'effectue la mise en place d'un nouvel équilibre. Le procédé FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) est très connu, où une partie de la préparation est décolorée par un éclairage puissant et où l'on mesure ensuite la redistribution de la fluorescence dans ce secteur.
Ces expériences permettent de déduire la perméabilité des membres, la vitesse de diffusion et le comportement de liaison des molécules. L'enregistrement de séries temporelles est toujours associé à une mesure de ce type.

10.6 Séries spectrales

La section 10.2.4 décrit comment le détecteur Leica SP® peut sélectionner des bandes d'émission réglables en continu. Ici aussi, il est possible de faire un enregistrement en série en utilisant le déplacement incrémentiel de la bande d'émission. Le détecteur Leica SP® a donc été le premier appareil permettant d'enregistrer des séries d'images spectrales dans un microscope confocal. La technologie utilisée a fait ses preuves et s'est avérée être la plus efficace. En effet, tous les autres microscopes spectraux apparus entre-temps sur le marché présentent de nettes faiblesses eu égard au rapport signal-bruit.

10.6.1 Enregistrement et utilisation des données

L'enregistrement d'une série Lambda ne diffère pas fondamentalement de celui d'une série z ou d'une série chronologique. On détermine la bande d'émission pour le début et la fin de la mesure et stipule combien de coupes le spectromètre doit réaliser pour mesurer la région entrée.
Des régions de l'image sont sélectionnées de façon interactive pour l'évaluation ; leur intensité moyenne est ensuite représentée dans un graphe en tant que fonction de la longueur d'onde. C'est un spectre à l'endroit sélectionné.

10.6.2 Au sujet de la résolution spectrale

Il y a eu dernièrement en relation avec les séries spectrales une discussion portant sur la technologie qui offre la meilleure résolution spectrale et permet donc de révéler les modifications les plus fines survenues dans le spectre. De fait, l'on peut déplacer avec le TCS SP5 les bandes d'émission par pas d'1 nm, ce qui donne une résolution formelle d'un nanomètre. La résolution spectrale optique dépend de toute façon de la longueur d'onde ; elle est d'environ 0,5 nm dans le bleu et 2 nm dans le rouge. Cette résolution est bien supérieure aux exigences requises dans la pratique : dans les préparations typiques, de consistance liquide à gélatineuse à température ambiante, la netteté des émissions de fluorescence ne dépasse guère 20 nm.

10.7 Combinatorique

L'association de bon nombre des procédés décrits plus haut est possible, ce qui ouvre de nouvelles perspectives en biologie, autant sur les préparations fixées que sur les préparations vivantes. De cette combinatorique est né le concept de "microscopie multidimensionnelle". De toute façon, il est facile de constater ici une certaine inflation. Il ne suffit pas de multiplier les dimensions (paramètres de mesure) pour faire une bonne expérience et encore moins obtenir un bon résultat. La synthèse de nombreuses mesures est souvent difficile et requiert l'intervention de l'intelligence humaine, afin d'éviter l'accumulation de données inutiles et les conclusions erronées.

11. Maintenance et entretien

11.1 Généralités

Vous trouverez dans le mode d'emploi du microscope des informations sur la maintenance et l'entretien du microscope.

Les instructions et les informations supplémentaires concernant les composants du système à foyer commun sont résumées ci-dessus.

Protégez le microscope de la poussière et de la graisse.

Lorsque vous n'utilisez pas le système, recouvrez-le toujours d'une housse (comprise dans la livraison) ou d'un tissu en coton propre. Le système doit être activé dans un environnement aussi exempt de poussière et de graisse que possible.
Si aucun objectif ne se trouve dans le revolver à objectifs, les emplacements des objectifs doivent être pourvus de leur cache anti-poussière.

Utilisez les produits chimiques agressifs avec grande précaution.

Soyez extrêmement prudent lorsque vous utilisez en cours de travail des acides, des solutions alcalines ou d'autres produits chimiques agressifs. Prenez garde à ce que ces substances n'atteignent pas les composants optiques et mécaniques du système.

11.2 Nettoyage du système optique

Le système optique du microscope doit toujours être nettoyé. Il ne faut en aucun cas toucher les composants optiques avec les doigts ou quelque chose de sale ou de gras.
Eliminez la poussière à l'aide d'un pinceau fin et sec. Si cela ne suffit pas, vous pouvez utiliser un chiffon non pelucheux, imbibé d'eau distillée.
Les saletés tenaces déposées sur la surface du verre s'enlèvent avec de l'alcool pur ou du chloroforme.
Si une lentille d'objectif a été contaminée accidentellement par de l'huile d'immersion non adaptée ou par l'échantillon, veuillez vous adresser à votre agence Leica la plus proche. On vous y donnera des conseils sur certains solvants à utiliser pour le nettoyage.
Laissez-vous conseiller dans le choix du solvant adapté, car certains solvants peuvent dissoudre la colle utilisée pour fixer la lentille.

N'ouvrez jamais les objectifs pour les nettoyer !

Les lentilles d'immersion doivent être jetées directement après leur utilisation dans l'huile d'immersion.

Enlevez l'huile d'immersion ensuite avec un chiffon propre. Une fois que vous avez enlevé une grande partie de l'huile d'immersion, placez un tissu fin adapté aux lentilles sur la face d'immersion de la lentille. Faites tomber une goutte du solvant que l'on vous a conseillé et frottez doucement avec le tissu sur la surface de la lentille. Répétez la procédure jusqu'à ce que la lentille soit absolument propre. Utilisez à chaque fois un nouveau morceau de tissu propre.

11.3 Nettoyage de la surface du microscope

Utilisez un chiffon non pelucheux en coton ou une peau de chamois (humecté d'alcool) pour nettoyer la surface du boîtier de microscope ou du scanneur (pièces peintes).

Ne jamais utiliser d'acétone, de xylol ou de diluant nitré car ces produits attaquent la peinture !

Tous les composants et systèmes Leica ont été fabriqués soigneusement selon les méthodes de production les plus modernes. Si vous rencontrez des problèmes avec votre appareil, n'essayez pas de réparer vous-même l'appareil ou les composants, mais adressez-vous à votre représentation Leica.

Avant tout déplacement du système confocal, il faut le nettoyer minutieusement. Ceci concerne particulièrement les systèmes, qui se trouvent dans les laboratoires de recherche biomédicale.

Ceci est nécessaire afin d'éviter une éventuelle contamination et de faire courir un danger à d'autres personnes. Prenez garde non seulement à la surface mais aussi aux ventilateurs et climatiseurs, car ces appareils sont de véritables nids à poussière.

11.4 Maintenance du système de refroidissement du scanneur

Le scanneur du système est équipé d'un liquide de refroidissement.
Suivez les instructions de la feuille de données de sécurité du fabricant Innovatek concernant le réfrigérant utilisé (elle est en annexe).

Le refroidissement du scanneur doit faire l'objet tous les deux ans d'une maintenance par le service après-vente de Leica ou le service agréé par Leica.

En cas d'émergence de liquide de refroidissement, le système doit être immédiatement mis hors tension ! Informez-en immédiatement le service après-vente de Leica ou le service agréé par Leica.

Le liquide de refroidissement est mélangé à une substance irritante. Evitez tout contact avec les yeux et la peau.

12. Transport et dépollution

12.1 Changement de lieu d'installation

Avant tout déplacement du microscope laser à balayage, il faut le nettoyer à fond. En cas d'enlèvement des pièces du système, il faut les nettoyer à fond. Ceci concerne particulièrement les systèmes, qui se trouvent dans les laboratoires de recherche biomédicale.

Cela est nécessaire pour supprimer toute contamination éventuelle et éviter ainsi le déplacement de substances dangereuses et d'agents pathogènes et la mise en danger de personnes.

Prenez garde non seulement à la surface mais aussi aux ventilateurs et climatiseurs, car ces appareils sont de véritables nids à poussière.

12.2 Élimination des déchets

Pour toute question concernant l'élimination des déchets, veuillez vous adresser directement à votre point de vente local Leica (voir chapitre 13).

13. Contact

Pour toute autre question concernant votre système, veuillez vous adresser directement à votre succursale Leica. Vous trouverez l'adresse de contact concernée dans la liste de nos représentations locales dressée ci-dessous.

Si votre pays n'est pas mentionné dans la liste, veuillez consulter la rubrique "Area Selector" sous le site Internet http://www.leica-microsystems.com.

Pays	Ville	Téléphone	Télécopie
Australia	Gladesville	+61 2 9879 9700	+61 2 9817 8358
Austria	Vienna	+43 1 486 80 50 0	+43 1 486 80 50 30
Canada	Richmond Hill Ontario	+1 905 762 2000	+1 905 762 8937
Denmark	Herlev	+45 4454 0101	+45 4454 0111
France	Rueil-Malmaison	+33 1 473 285 85	+33 1 473 285 86
Germany	Wetzlar	+49 6441 29 0	+49 6441 29 2590
Italy	Milan	+39 0257 4861	+39 0257 40 3273
Japan	Tokyo	+ 81 3 5421 2800	+81 3 5421 2896
Korea	Seoul	+82 2 514 65 43	+82 2 514 65 48
Netherlands	Rijswijk	+31 70 4132 100	+31 70 4132 109
PRC	Hong Kong	+852 2564 6699	+852 2564 4163
Portugal	Lisbon	+351 21 388 9112	+351 21 385 4668
Singapore		+65 6779 7823	+65 6773 0628
Spain	Barcelona	+34 93 494 95 30	+34 93 494 95 32
Sweden	Sollentuna	+46 8 625 45 45	+46 8 625 45 10
Switzerland	Glattbrugg	+41 1 809 34 34	+41 1 809 34 44
United Kingdom	Milton Keynes	+44 1908 246 246	+44 1908 609 992
USA	Bannockburn/ Illinois	+1 847 405 0123	+1 847 405 0164

14. Glossaire

Achromate
Classe de correction d'un objectif. Pour les objectifs de ce type, l'aberration chromatique est corrigée pour deux longueurs d'onde. D'habitude, un tel objectif est corrigé pour une longueur d'onde sous 500 nm et au-dessus de 600 nm. En outre, la relation des sinus pour une longueur d'onde est respectée. La courbure de champ n'est pas corrigée.

Disque d'Airy
On appelle disque d'Airy le cercle interne clair (entouré d'anneaux de diffraction alternativement foncés et clairs) de l'image diffractée composée d'une source de lumière ponctuelle. Les disques de diffraction de deux points d'objet situés l'un à côté de l'autre se superposent partiellement ou totalement et limitent ainsi le pouvoir séparateur spatial.

Aliasing
Erreur de construction générée par un taux de balayage trop faible par rapport à la fréquence du signal.

AOTF
(Acousto-Optical Tunable Filter) Le filtre acousto-optique réglable est un cristal transparent optiquement, avec lequel on peut régler en continu l'intensité et la longueur d'onde de la lumière incidente. Dans le cristal, un champ à ondes ultrasonores, dont la longueur d'onde peut être réglée à volonté, est produit. Perpendiculairement au champ d'ondes ultrasonores, la lumière incidente se diffracte comme sur un quadrillage.

Apochromate
Classe de correction d'un objectif. Avec les objectifs de ce type, l'aberration chromatique est corrigée pour trois longueurs d'ondes (la plupart du temps 450 nm, 550 nm et 650 nm) et la relation des sinus est respectée pour au moins deux couleurs. La courbure de champ n'est pas corrigée.

Distance de travail
Distance de la lentille frontale d'un objectif pour la mise au point. Pour une distance de travail variable, il faut indiquer l'éloignement entre la lentille frontale de l'objectif et le couvre-objet ou l'échantillon non couvert. La plupart des objectifs possédant une grande distance de travail présentent une faible ouverture numérique, en revanche les objectifs de grande ouverture présentent une faible distance de travail. Pour un objectif présentant une grande ouverture et une grande distance de travail, le diamètre de la lentille de l'objectif doit être grand, en correspondance. Il s'agit pour la plupart d'optiques faiblement corrigées, car le respect des précisions de fabrication extrêmes pour un grand diamètre de lentille ne peut être atteint qu'au prix d'un grand effort.

Enregistrement de paramètres de prise de vue
Un enregistrement de paramètres de prise de vue (IPS : Instrument Parameter Setting) est un fichier contenant tous les réglages matériels spécifiques à une technique de prise de vues donnée. Les abréviations FITC/TRITC désignent par exemple les réglages pour un enregistrement dans deux canaux avec les deux couleurs fluorescentes FITC et TRITC. Un enregistrement de paramètres de prise de vue permet d'enregistrer des configurations de matériel optimisées dans un fichier et de les charger ultérieurement simplement au moyen d'un double clic. Les enregistrements de paramètres mis en évidence par la lettre "L" sont prédéfinis par Leica et ne peuvent pas être modifiés. Les enregistrements définissables par l'utilisateur se trouvent dans l'arborescence sous la lettre "U" (User).

Courbure de champ
La surface courbée, sur laquelle est représentée nettement une image microscopique, est appelée courbure de champ. Elle est produite par la convexité de la lentille et se manifeste comme une erreur à cause des faibles distances focales pour les objectifs microscopiques. Ainsi l'objet ne peut pas ainsi être représenté de façon nette à la fois au centre et à la périphérie. Les objectifs qui présentent une correction par rapport à la courbure de champ sont appelés objectifs plans (plan = champ d'image plan).

Indice de réfraction
Facteur pour lequel la vitesse de la lumière dans un milieu optique est inférieure à celle dans le vide.

Aberration chromatique
Erreur de construction optique provoquée par la réfraction différente des rayons lumineux de diverses longueurs d'onde sur une lentille. De ce fait, les rayons lumineux avec une longueur d'onde plus courte présentent une distance focale plus longue que les rayons lumineux avec une longueur d'onde plus longue.

Dichroïte
Les filtres dichroïques sont des filtres d'interférence pour un angle d'incidence de la lumière de 45°. La transmitivité ou la réflexivité des dichroïtes dépend d'une certaine longueur d'onde de la lumière. Pour un filtre passe-bas RSP 510 (reflection short pass) par exemple, la lumière d'excitation inférieure à 510 nm est réfléchie et elle est transmise lorsqu'elle est supérieure à cette valeur. Les valeurs de transmission se trouvent généralement entre 80% et 90%, les valeurs de réflexion entre 90% et 95%.

Filtre numérique respectant les phases
Un filtre numérique se compose d'une règle de calcul, selon laquelle des données d'image peuvent être modifiées. Pour les filtres, on essaye toujours d'éloigner des composants d'image parasites. Un filtre respectant les phases garantit que les tailles quantifiables d'image demeureront inchangées par le filtrage et est ainsi une condition pour des méthodes de mesure standardisées (par ex. caractérisation de surfaces selon ISO).

Double dichroïte
Les filtres double dichroïques sont des filtres d'interférence pour un angle d'incidence de la lumière de 45°. La transmitivité ou la réflexivité des dichroïtes doubles dépend de deux longueurs d'onde de la lumière fixes. Pour une dichroïte double DD 488/568 par exemple, la lumière d'excitation est réfléchie à 488 nm et 568 nm et transmise au-delà de ces valeurs. Les valeurs de transmission se situent généralement autour de 80%, les valeurs de réflexion entre 90% et 95%.

Experiment
Fichier au format Leica spécifique (*.lei), pouvant comporter plusieurs images individuelles ou des séries d'images. Cela permet de réunir des images prises selon des paramètres de balayage différents ou des images qui ont été traitées.

Colorant fluorescent
Colorant utilisé pour l'analyse, qui réagit à l'excitation de l'énergie lumineuse en émettant une lumière d'une longueur d'onde différente (loi de Stokes). Par exemple : fluorescéine, rhodamine, éosine, diphénylamine (DPA).

Microscopie par fluorescence
Procédé de contraste d'optique lumineuse pour représenter des structures fluorescentes. Les échantillons autofluorescents disposent d'une fluorescence dite primaire. Ils n'ont pas besoin d'être enrichis par des substances fluorescentes supplémentaires. Des substances fluorescentes secondaires doivent en revanche d'abord muter grâce à des colorants adaptés, appelés fluorochromes. Des teintures spécifiques permettent ainsi de localiser exactement les éléments de structure colorés d'un objet. La microscopie par fluorescence permet aussi bien d'exécuter un potentiel d'examens morphologiques que d'effectuer des examens dynamiques sur un plan moléculaire.

Objectif au fluor
Classe de correction d'un objectif. Les objectifs au fluor sont semi-apochromatiques, c'est-à-dire que par le degré de correction, ils se situent entre les objectifs achromatiques et apochromatiques.

Frame (cadre)
Un cadre correspond à un enregistrement d'une coupe optique individuelle. Si on enregistre par exemple une coupe optique individuelle 4 x (pour faire la moyenne des données et éliminer les bruits), alors quatre cadres (frame) sont produits pour cette coupe optique.

Objectif à immersion
Objectif microscopique qui a été développé sous la condition d'utiliser des milieux d'immersion. Utiliser aucun ou un mauvais milieu d'immersion avec un objectif à immersion peut conduire à des pertes de résolution et des détériorations de la correction.

Laser IR
Laser d'une longueur d'onde > 700 nm, rayonnement laser invisible (infrarouge).

Sous-méthodes confocales
Ces méthodes dérivées des méthodes de contraste classiques (fond clair, contraste interférentiel, contraste de phase, polarisation) servent à examiner les microstructures en association avec un système confocal. Ces méthodes définissent chaque fois une configuration déterminée d'éléments optiques (bloc de filtres, prismes ICT, anneaux de phase). Certaines d'entre elles dépendent en outre de l'objectif sélectionné.

Confocalité
Alors que le concept optique d'un microscope classique assure une détection identique des composants de l'image, quelle que soit leur netteté, le principe confocal élimine les structures situées hors du plan de mise au point de l'objectif du microscope. C'est à cela que servent les diaphragmes, placés sur des lieux de conjonction optique sur le trajet optique. Ils fonctionnent comme une source lumineuse ponctuelle (diaphragme d'excitation) et comme détecteur de points (diaphragme de détection). Le diamètre du diaphragme de détection détermine la longueur d'onde et l'ouverture numérique de l'objectif utilisé, mais aussi l'étendue axiale d'une coupe optique (résolution optique).

Filtre passe-bas
Les filtres passe-bas sont des filtres d'interférence qui transmettent la lumière à ondes courtes et reflètent en revanche la lumière à ondes longues. Le filtre optique passe-bas est caractérisé par l'indication d'arête de longueur d'onde, sur laquelle le filtre passe de la transmission à la réflexion (seuil de 50%).

Série lambda
Pile composée d'images individuelles d'un plan optique unique, qui sont détectées chaque fois avec une longueur d'onde déterminée.

Filtre passe-haut
Les filtres passe-haut sont des filtres d'interférence qui réfléchissent la lumière à ondes courtes et sont transparents en revanche pour la lumière à ondes longues. Le filtre optique passe-haut est caractérisé par l'indication d'arête de longueur d'onde, sur laquelle le filtre passe de la transmission à la réflexion (seuil de 50%).

Grossissement à vide
Grossissement sans autre gain d'information. On parle de grossissement à vide, dès que des distances inférieures au pouvoir séparateur sont représentées. Les grossissements à plus grande échelle que celle du grossissement à vide ne mettent à jour aucune autre information sur l'objet et ne font qu'altérer la netteté d'image et le contraste.

Laser MP
Multiphoton désigne un laser IR (laser infrarouge) caractérisé par un important flux de photons (produit par un laser à impulsions).

Filtre neutre
Les filtres neutres sont des petites plaques de verre partiellement recouvertes d'un miroir. Ils servent à répartir le trajet optique indépendamment de la longueur d'onde. La lumière incidente est partiellement réfléchie et partiellement transmise. Les filtres neutres sont normalement placés à un angle de 45° dans le trajet du faisceau. Les données assignées d'un filtre neutre se rapportent au rapport de la réflexion sur la transmission. Pour un filtre neutre RT 30/70 par exemple, 30% de la lumière d'excitation sont réfléchis et 70% sont transmis.

Ouverture numérique
L'ouverture est le sinus de l'angle d'ouverture dans lequel la lumière entre dans la lentille frontale d'un objectif microscopique ; Symbole NA. A côté de la luminosité, l'ouverture influence aussi le pouvoir séparateur d'une optique d'objectif. Comme il peut exister plusieurs milieux entre l'objectif et la préparation (par ex. le milieu encastrant la préparation), l'ouverture numérique est d'habitude (NA = n * sina) utilisée comme unité de mesure pour l'intensité lumineuse et le pouvoir séparateur.

Blanchiment optique
Destruction de colorants fluorescents, appelés fluorochromes, par un éclairage intensif. Dans la microscopie par fluorescence, les fluorochromes sont excités à l'aide de la lumière laser dans un haut état d'énergie, le niveau singulet. Si les molécules excitées retombent à leur état de base, un signal fluorescent est émis. En cas d'excitation avec une intensité trop élevée, les molécules de colorants peuvent passer par intercroisement d'un état de singulet à un état de triplet. En raison de la durée de vie bien plus longue des états de triplet (phosphorescence), ces molécules excitées peuvent réagir chimiquement avec les acides triplets et sont perdues pour une autre excitation de fluorescence.

Visualisation des phases
Le principe de visualisation des phases, utilisé par Leica, est une méthode alternative optimisée par rapport aux représentations ratiométriques. Le domaine d'application principal est la mesure de concentrations ioniques en physiologie. La visualisation des phases obtient au contraire du procédé ratiométrique plus d'informations sur l'échantillon. C'est pourquoi ce procédé permet d'adapter la représentation des données physiologiques à la dynamique de l'œil humain. Vous pouvez demander des informations détaillées sur le principe de visualisation des phases directement auprès de Leica Microsystems CMS GmbH.

Pixel
Mot issu des termes anglais picture et element. Un pixel est le plus petit élément d'image indivisible dans un système à deux dimensions. Dans ce document, on désigne par pixel aussi bien un spot analyseur dans la préparation qu'un point d'image.

Objectif plan
Classe de correction d'un objectif. Pour les objectifs de ce type, la courbure de champ est corrigée. L'élimination de cette erreur requiert une lentille très concave et à forte densité médiane. Selon le type d'aberration supplémentaire chromatique corrigée, on distingue les objectifs planachromatique, planapochromatique et plan au fluor

ROI
Cette abréviation signifie "Region of Interest / Région d'intérêt". Une ROI comprend une région sur laquelle sera effectuée une exploitation de mesure. Une ROI peut de plus caractériser la région d'intérêt d'un échantillon devant être balayée (balayage ROI).

Rapport signal/fumée
Rapport des signaux, qui sont détectés dans la préparation, par rapport aux signaux indésirables, qui proviennent des divers composants optiques et électroniques et qui sont aussi captés par le détecteur.

Aberration sphérique
Aberration optique due au fait que des rayons lumineux de longueur d'onde identique et parallèles à l'axe ne sont pas à la même distance de l'axe optique. Les rayons lumineux, qui traversent la zone extérieure de la lentille, présentent une distance focale plus courte que les rayons qui traversent le milieu de la lentille (axe optique).

La loi de Stokes
La loi de Stokes est un concept central de la microscopie par fluorescence. Si les molécules fluorescentes sont excitées avec une lumière d'une certaine longueur d'onde, elles émettent une lumière d'une autre longueur d'onde, plus longue. Cette différence entre lumière d'excitation et lumière fluorescente est appelée la loi de Stokes. Sans la loi de Stokes, il ne serait pas possible dans un microscope par fluorescence de séparer la lumière d'excitation de forte intensité des signaux fluorescents de faible intensité.

Triple dichroïte
Les filtres triple dichroïques sont des filtres d'interférence pour un angle d'incidence de la lumière de 45°. La transmitivité ou la réflexivité des dichroïtes triples dépend de trois longueurs d'onde de la lumière fixes. Pour une dichroïte triple TD 488/568/647 par exemple, la lumière d'excitation est réfléchie à 488 nm, 568 nm et 633 nm et transmise au-delà de ces valeurs. Les valeurs de transmission se situent généralement autour de 80%, les valeurs de réflexion entre 90% et 95%.

Objectif sec
Objectif microscopique utilisé sans milieu d'immersion. Entre la lentille d'objectif et la préparation se trouve de l'air.

Laser UV
Laser d'une longueur d'onde < 400 nm, rayonnement laser invisible.

Laser VIS
Laser ayant une plage de longueurs d'ondes comprise entre 400 et 700 nm, rayonnement laser visible.

Voxel
Mot issu des termes anglais volume et pixel. Un voxel est le plus petit élément de volume indivisible dans un système à trois dimensions. Dans ce document, on désigne par voxel aussi bien un élément de volume dans la préparation qu'un point d'image en 3D.

Laser à lumière blanche [10]
Laser avec lequel on peut sélectionner simultanément jusqu'à 8 bandes de longueurs d'onde dans la plage de longueurs d'onde de 470 à 670 nm.

Piles z
Les piles z se composent d'images bidimensionnelles qui ont été prises avec différents plans de mise au point et sont représentées en trois dimensions.

[10] Concerne seulement le système TCS SP5 X.

15. Annexe

15.1 Fiches techniques de sécurité des constructeurs tiers

Le scanneur est équipé d'un liquide de refroidissement.
Vous trouverez ci-après les fiches techniques de sécurité du fabricant Innovatek pour le réfrigérant utilisé.

1. Substance/preparation and company name

Trade name: innovatekProtect IP
company: innovatek OS GmbH, Stadtweg 9, 85134 Stammham
Tel: 08405/92590
Fax: 08405/925921
Emergency phone No.: 08405/92590

2. Composition / information on ingredients

Chemical nature:	Ethylene glycol (ethane diol). Corrosion inhibitors.	
Hazardous Compounds:		
Ethanediol	Content (w/w): >90 % EC No: 203-473-3 INDEX No: 603-027-00-1	CAS No: 107-21-1 Hazard symbol: Xn R-phrases: 22
2-ethylhexanoic acid, sodium salt	Content (w/w): 2 % - 3 % EC No: 243-283-8	CAS No: 19766-89-3 Hazard symbol: Xn

R-phrases: 63 The wording of the hazard symbols and R-phrases is specified in Chapter 16 if dangerous ingredients are mentioned.

3. Hazard identification

Harmful if swallowed.

4. First aid measures

General advice:	Remove contaminated clothing.
If inhaled:	If difficulties occur after vapour/aerosol has been inhaled: fresh air, summon physician.
On skin contact:	Wash thoroughly with soap and water.
On contact with eyes:	Wash affected eyes for at least 15 minutes under running water with eyelids held open.
On ingestion:	Rinse mouth immediately and then drink plenty of water, seek medical attention.
Note to physician:	Symptomatic treatment (decontamination, vital functions). Administer 50 ml of pure ethanol in a drinkable concentration.

5. Fire fighting measures

Suitable extinguishing media:	Water spray, alcohol-resistant foam, dry extinguishers, carbon dioxide (CO_2).
Special protective equipment:	In case of fire, wear a self contained breathing apparatus.
Further information:	The degree of risk is governed by the burning substance and the fire conditions. Contaminated extinguishing water must be disposed of in accordance with local legislation.

6. Accidental release measures

Personal precautions:	Avoid excessive contact with skin and eyes. In case of release of larger amounts remove contaminated clothing and wash body down thoroughly with water. Hand protection. Pick up immediately as product renders floors slippery.
Environmental precautions:	Contain contaminated water/firefighting water. Do not discharge product into natural waters without pretreatment (biological treatment plant).
Methods for cleaning up / taking up:	Bind the liquid by using suitable absorbent material (saw dust, sand, etc.) and dispose of in accordance with the regulations. Wash away spills thoroughly with large quantities of water. In case of release of larger quantities which might flow into the draining system or waters, contact appropriate authorities.

7. Handling and storage

Handling:	Ensure thorough ventilation of stores and work areas.
Protection against fire and explosion:	Take precautionary measures against static discharges. If exposed to fire, keep containers cool by spraying with water.
Storage:	Product is hygroscopic. Containers should be stored tightly sealed in a dry place. Storage in galvanized containers is not recommended.

8. Exposure controls and personal protection

Components with workplace control parameters:

107-21-1: Ethylene glycol	MAK value (D): 26 mg/m 3 = 10 ppm (TRGS 900 (DE)). Top limit category 1. There is no reason to fear a risk of damage to the developing embryo when the MAK value is adhered to. Skin resorption hazard: wear suitable gloves (see below).
Personal protective equipment	
Respiratory Protection:	Do not inhale gases/vapours/aerosols.
Hand protection:	Chemical resistant protective gloves (EN 374). Recommended: nitrile rubber, protective index 6. Manufacturers directions for use should be observed because of great diversity of types.
Eye protection:	Safety glasses with side-shields (frame goggles, EN 166)
General safety and hygiene measures:	The usual precautions for the handling of chemicals must be observed.

9. Physical and chemical properties

Form:	Liquid	
Colour:	Colourless	
Odour:	Product specific	
pH value (500 g/l, 20 °C):	7.0 - 9.0	
Solidification temperature:	< -18 °C (DIN/ISO 3016)	
Boiling point/range:	>= 165 °C	(ASTM D 1120)
Flash point:	>120 °C	(DIN/ISO 2592)
Lower explosion limit:	3.0 % vol.	
Upper explosion limit:	15.0 % vol	

10. Stability and reactivity

Substances to avoid:	Strong oxidizing agents.
Hazardous reactions:	No hazardous reactions when stored and handled according to instructions.
Hazardous decomposition products:	No hazardous decomposition products if stored and handled as prescribed/indicated.

11. Toxicological data

LD50/oral/rat: >2000 mg/kg
LD50/dermal/rabbit: >2000 mg/kg (literature data)
Primary skin irritation/rabbit/: non-irritant

Information on Ethylene glycol:

Further information:	Developmental toxicity was observed after oral ingestion of high doses in studies with rats and mice, but this effect was not seen in a study with rabbits.
Experiences in humans:	Lethal dose if swallowed approx. 1.5 g/kg body weight. Lethal dose approx. 90-110 g for adults, and correspondingly less for children. Smaller doses can result in: consciousness is affected, kidney damage, damage to the central nervous system.
Additional information:	The statements are based on the properties of the individual components. There is no reason to fear a risk of damage to the developing embryo or fetus when the MAK value is adhered to.The whole of the information available provides no indication of a carcinogenic effect.

12. Ecological information

Ecotoxicity:	Toxicity to fish: Leuciscus idus/LC50 (96 h): >100 mg/l Aquatic invertebrates: daphnia magna/EC50 (48 h): >100 mg/l Aquatic plants: algae/EC50 (72 h): >100 mg/l Microorganisms/Effect on activated sludge: Inhibition of degradation activity in activated sludge is not to be anticipated during correct introduction of low concentrations.
Persistence and Degradability:	Elimination information: Test method: OECD 301A (new version) Method of analysis: DOC reduction Degree of elimination: >70 % Evaluation: readily biodegradable.
Additional information:	Other ecotoxicological advice: Do not release untreated into natural waters. The product has not been tested. The statement was derived from the properties of the individual components.

13. Disposal considerations

innovatekProtect must be dumped or incinerated in accordance with local regulations.

Contaminated packaging:	Uncontaminated packs can be reused. Packs that cannot be cleaned should be disposed of in the same manner as the contents.

14. Transport information

Not classified as hazardous under transport regulations.
(ADR RID ADNR IMDG/GGVSee ICAO/IATA)

15. Regulatory information

Regulations of the European union (Labelling) / National legislation / Regulations:
Directive 1999/45/EEC („Preparation Directive“)

Hazard Symbol:	Xn:	Harmful
R-phrases:	22:	Harmful if swallowed
S-phrases:	2:	Keep out of reach of children
	24/25:	Avoid contact with skin and eyes
	46:	If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label

Hazard determinant component for labelling:	Ethanediol
Other regulations:	none

16. Further Information

Full text of hazard symbols and R-phrases if mentioned as hazardous components in chapter 2:
Xn: Harmful
22: Harmful if swallowed.
63: Possible risk of harm to the unborn child.

Vertical lines in the left hand margin indicate an amendment from the previous version.
This safety data sheet is intended to provide information and recommendations as to: 1. how to handle chemical substances and preparations in accordance with the essential requirements of safety precautions and physical, toxicological, and ecological data. 2. how to handle, store, use, and transport them safely.
No liability for damage occured in connection with the use of this information or with the use, application, adaption, or processing of the products here described will be accepted. An exception will be made in the case that our legal representatives should come to be held responsible and liable by reason of intent or gross negligence. No liability will be accepted for damage indirectly incured.
We provide this information and data according to our present level of knowledge and experience. No assurances concerning the characteristics of our product are hereby furnished.

15.2 Déclaration de conformité

Leica
MICROSYSTEMS

EC Declaration of Conformity

Manufacturer:	*Leica Microsystems CMS GmbH*
Address:	*Am Friedensplatz 3* *Germany, 68165 Mannheim*
Product:	***TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope*** ***TCS SP5 X Confocal Laser Scanning Microscope***

We declare that the product described herein complies with the following European Directives:

2004/108/EG Directive on Electromagnetic compatibility

2006/95/EG Directive on Low-voltage equipment

The product conforms to the standards:

EN 61326-1:2006
Electrical equipment for measurement, control and laboratory use - EMC requirements – Part 1: General requirements
Emission Class A

EN 61010-1: 2001
Safety requirements for electrical equipment for measurement, control and laboratory use; Part 1: General requirements

EN 60825-1: 1994 + A2: 2001 + A1:2002
Safety of laser products
Part 1: Equipment classification, requirements and user's guide

Manager Research & Development

Mannheim, Germany
February 04, 2008

Dr. Lucius Remer

Leica Microsystems CMS GmbH Tél. : +49 (0)621 7028 - 0
Am Friedensplatz 3 Fax : +49 (0)621 7028 - 1028
D-68165 Mannheim (Germany) http://www.leica-microsystems.com

Copyright © Leica Microsystems CMS GmbH • All rights reserved

N° de commande : 156500003 | V08